

-Tesis Doctoral-

“Resistencia a xenobióticos y procesos de detoxificación. Estudios moleculares en *Varroa destructor* y *Apis mellifera*”



Licenciada Giulia Angelica Mitton

Director: Dr Sergio R Ruffinengo

Co-director: Dr Matías D Maggi

Centro de Investigación en Abejas Sociales

Universidad Nacional de Mar del Plata- CONICET

-2019-

Índice

Resumen	5
Abstract	7
1.1 Introducción	9
1.1.1 Biología de <i>Apis mellifera</i>	10
1.1.2 Pérdida de colonias: introducción a la sanidad de <i>Apis mellifera</i>	14
1.1.3 <i>Varroa destructor</i>	15
1.1.3.1 Morfología y adaptaciones al parasitismo de <i>Varroa destructor</i>	16
1.1.3.2 Ciclo de vida de <i>Varroa destructor</i>	17
1.1.3.3 Daños ocasionados por <i>Varroa destructor</i>	20
1.1.3.4 Control de <i>Varroa destructor</i>	23
1.1.3.5 Resistencia a acaricidas de síntesis	25
1.2 Objetivo general	26
2 Capítulo II: Estudio de la resistencia a acaricidas de síntesis en <i>Varroa destructor</i>	28
2.1 Introducción	28
2.1.1 Objetivos Particulares	30
2.1.2 Hipótesis	30
2.2 Materiales y métodos	31
2.2.1 Toma de muestras de las poblaciones de ácaros	31
2.2.1.1 Uruguay	31
2.2.1.2 Argentina	32
2.2.2 Obtención de ácaros	33
2.2.3 Bioensayos	33
2.2.4 Análisis estadísticos	36
2.3 Resultados	37
2.3.1 Bioensayos en poblaciones de Uruguay	37
2.3.2 Bioensayos en población de Argentina	39
2.4 Discusión	42
3 Capítulo III: Mecanismos moleculares de la resistencia a acaricidas de síntesis en <i>Varroa destructor</i>	50
3.1 Introducción	50
3.1.1 Objetivos particulares	54
3.1.2 Hipótesis:	54
3.2 Materiales y Métodos	54
3.2.1 Estudio del mecanismo de resistencia a los piretroides: flumetrina y tau-fluvalinato	54

3.2.1.1	Toma de muestras de las poblaciones de ácaros.....	55
3.2.1.2	Extracción de ADN.....	55
3.2.1.3	Diseño de oligonucleótidos o cebadores	56
3.2.1.4	PCR en tiempo Real	57
3.2.1.5	Secuenciación.....	58
3.2.2	Estudio de mecanismo de resistencia al cumafós.....	58
3.2.2.1	Toma de muestras de la población de ácaros en estudio	58
3.2.2.2	Extracción de ARN.....	59
3.2.2.3	Retrotranscripción	60
3.2.2.4	Oligonucleótidos	60
3.2.2.5	Amplificación por PCR en tiempo real.....	61
3.3	Resultados	62
3.3.1	Mecanismos de resistencia a la flumetrina	62
3.3.2	Estudio de mecanismo de resistencia al cumafós.....	64
3.4	Discusión.....	67
4	Capítulo IV: Estudio de la suplementación dietaria con fitomoléculas en <i>Apis mellifera</i> para mitigar los efectos de los acaricidas de síntesis	72
4.1	Introducción	72
4.1.1	Objetivos particulares:	78
4.1.2	Hipótesis.....	79
4.2	Materiales y métodos.....	79
4.2.1	Obtención de abejas.....	79
4.2.2	Determinación de la DL ₅₀ de acaricidas de síntesis	79
4.2.3	Impacto de la dieta en la susceptibilidad a tau-fluvalinato.....	81
4.2.4	Estudios de expresión génica	83
4.2.4.1	Extracción de ARN.....	83
4.2.4.2	Digestión con ADNasa	84
4.2.4.3	Retrotranscripción	84
4.2.4.4	Amplificaciones por PCR en tiempo real	85
4.2.5	Estudios enzimáticos	86
4.2.5.1	Homogenización de tejidos	86
4.2.5.2	Determinación de proteínas	87
4.2.5.3	Actividad Glutación-S-Transferasa.....	87
4.2.5.4	Actividad Glutación Reductasa	88
4.2.5.5	Actividad Acetil Colinesterasa	88
4.2.5.6	Actividad Monooxigenasa P450	88
4.2.6	Análisis estadístico	88
4.3	Resultados	89

4.3.1	Impacto de la dieta en la susceptibilidad a acaricidas de síntesis	89
4.3.1.1	Determinación de la DL ₅₀ del cumafós en abejas recién emergidas y nodrizas	89
4.3.1.2	Determinación de la DL ₅₀ de amitraz y <i>tau</i> -fluvalinato en abejas nodrizas	90
4.3.1.3	Determinación de la toxicidad de fitomoléculas administradas en la dieta e impacto de la dieta en la susceptibilidad a <i>tau</i> -fluvalinato de abejas nodrizas	91
4.3.2	Expresión de genes de vías de detoxificación	95
4.3.3	Concentración de proteínas	96
4.3.4	Detoxificación y defensa antioxidante	98
4.3.4.1	Actividad Glutación-S-Transferasa	98
4.3.4.2	Actividad Glutación Reductasa	99
4.3.4.3	Actividad Monooxigenasa P450	100
4.3.4.4	Actividad Acetil Colinesterasa	101
4.4	Discusión	102
5	Consideraciones Finales	108
	Apéndices	111
6	Referencias bibliográficas	123



La abeja europea *Apis mellifera* L. tiene una gran importancia, tanto ecológica como económica, a nivel mundial. En los últimos años se han reportado muchas pérdidas de colmenas en distintas regiones del mundo. Entre las principales causas de la muerte de colonias, se encuentra el ácaro ectoparásito *Varroa destructor*. El objetivo de la presente Tesis Doctoral fue estudiar la problemática generada por *V. destructor*, considerando dos grandes cuestiones: I) la resistencia a acaricidas de síntesis en *V. destructor* y los posibles mecanismos que le dan origen, y II) el efecto de moléculas de origen vegetal como estrategia de mitigación de los daños colaterales ocasionados por los tratamientos con acaricidas de síntesis. Se evaluó el estado de resistencia a los acaricidas de síntesis de uso común en apicultura a través de bioensayos, en poblaciones de Argentina y Uruguay, y las alternativas para el manejo de la parasitosis. Se logró identificar un nuevo foco de resistencia a la flumetrina en poblaciones de ácaros de Uruguay. A su vez, no se observó reversión de la resistencia al cumafós en una población de ácaros que por siete años no había sido expuesta a dicho acaricida. Se estudiaron, además, las bases de la resistencia a flumetrina y cumafós mediante el desarrollo de protocolos para la aplicación de técnicas de biología molecular, lográndose identificar una mutación en el gen del canal de sodio en los ácaros de las poblaciones resistentes a la flumetrina. Por otra parte, se evaluó el efecto de moléculas de origen vegetal como potenciales mitigadoras de los efectos negativos ocasionados por los acaricidas de síntesis en abejas. Se observó que la suplementación con ácido indolacético (IAA) y ácido *p*-cumárico (Cum) en la dieta de abejas nodrizas aumenta la supervivencia de las mismas frente a la exposición al *tau*-fluvalinato. A su vez, se observó que la suplementación dietaria con dichas fitomoléculas causa cambios significativos en la actividad de enzimas de detoxificación. Los cambios enzimáticos relacionados con los mecanismos de detoxificación observados en las abejas que fueron alimentadas con Cum y con IAA

podrían ser los responsables de la mayor supervivencia observada frente a la exposición al *tau*-fluvalinato. Teniendo en cuenta los resultados reportados en la presente Tesis Doctoral, debe dirigirse especial atención a la interpretación de las dinámicas poblacionales de *V. destructor* en la región, de manera de poder implementar un Manejo Integrado de Plagas. También surgen resultados prometedores en cuanto al desarrollo de un producto a base de fitoquímicos, con el fin de mejorar la performance de las colonias de *A. mellifera* frente a posibles estresores a los que habitualmente se encuentran expuestas, como son los acaricidas de síntesis.

Abstract



The ectoparasitic mite *Varroa destructor* is potentially the greatest threat to honey bee colonies of *Apis mellifera* worldwide. The objective of this Doctoral Thesis was to study *Varroa destructor*'s problematic, considering two major issues: I) the resistance to acaricides in *V. destructor* and the possible mechanisms that give rise to it, and II) the effects of phytochemicals supplementation in the lifespan of honey bees and if that administration increases the detoxification mechanisms of bees against acaricides. We evaluated the state of resistance to the acaricides commonly used in beekeeping through bioassays in *Varroa* populations from Argentina and Uruguay, and the perspectives regarding management of this parasitosis. At the same time, the bases of resistance to flumethrin and coumaphos were studied, developing protocols for the application of molecular biology techniques. Moreover, we tested *tau*-fluvalinate-tolerance in nurse bees given by phytochemicals supplementation, registering that both *p*-coumaric acid (Cum) and indol-3-acetic acid (IAA) enhanced longevity of bees exposed to that drug. Changes in detoxification enzymes activity were also observed in bees fed with Cum or IAA. The results presented in this study demonstrate the importance of dietary phytochemicals in regulating detoxification. Taking into account the results reported in this Thesis, special attention should be paid to the interpretation of the population dynamics of *V. destructor* in the region, in order to implement an Integrated Pest Management. There are also promising results regarding the development of a product based on phytochemicals, in order to improve the performance of *A. mellifera* colonies against possible stressors to which they are usually exposed, such as synthetic acaricides.

Capítulo I: Introducción general



1.1 Introducción

La apicultura es una actividad agropecuaria fundamental ya que interviene en el mantenimiento del balance natural y la biodiversidad de los ecosistemas y juega un rol crucial en la polinización de cultivos (Potts et al., 2010). La mayor parte de las plantas cultivadas necesitan de la intervención de insectos para ser fecundadas. El 35% de los alimentos producidos en el mundo provienen de cultivos polinizados por insectos. A su vez, las abejas melíferas junto con otros polinizadores polinizan la vegetación silvestre, asegurando la preservación del paisaje y del ambiente (Klein et al., 2007). Además, proporciona diferentes productos para uso humano como miel, propóleos, polen, cera y jalea real. La especie de abeja más utilizada en dicha actividad es la abeja europea *Apis mellifera* L. (Figura 1).



Figura 1. Espécimen perteneciente a la especie de *Apis mellifera*¹

Esta especie es, sin dudas, el polinizador de cultivos cuya biología ha sido mejor estudiada. Su rango de distribución es amplio, habitando diferentes regiones de Europa, África y Asia (Smith, 1991). Actualmente se encuentra ampliamente extendida

¹ Extraída de <https://www.mexicampo.com.mx/se-reduce-la-poblacion-mundial-de-abejas/>.

en América, a consecuencia del traslado de colonias realizado por apicultores con fines productivos (Delaplane y Mayer, 2000).

1.1.1 *Biología de Apis mellifera*

Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae) es un insecto social que vive en colonias. Cada colonia está integrada por tres clases de individuos (castas): una reina, varios miles de obreras y algunos cientos de zánganos (Winston, 1987). La reina presenta un abdomen alargado y un aguijón curvo que solo es utilizado en la lucha contra otras reinas; tiene una cabeza en forma de corazón y glándulas mandibulares desarrolladas que segregan una feromona formada por dos componentes (9-ODA ((2E)ácido 9-oxodecenoico) o “sustancia de la reina” y 9-HDA ((2E) ácido 9-hidroxicenoico), cuyas funciones principales son las de inhibir la cría de reinas y la enjambrazón, prevenir el desarrollo de ovarios en las obreras, atraer zánganos para la cópula, y estabilizar el enjambre. Es responsable de las características generales de la colonia, debido a que el comportamiento de los demás integrantes depende de la información genética que aporta la reina, de las sustancias producidas por ella y de su edad. Durante toda su vida se alimenta con jalea real (Winston, 1987).

Las obreras son los individuos que forman parte de la colonia en mayor número (25.000 a 60.000, de acuerdo a la época del año). Presentan un tamaño menor al de las otras castas, cabeza triangular con tres ocelos y dos ojos compuestos, glándulas hipofaríngeas y mandibulares (producen el alimento larval), glándulas cereras, y glándulas de Nasanoff; poseen un aguijón que utilizan para la defensa y corbículas en el tercer par de patas para la recolección de polen; se alimentan de jalea real en sus primeros tres días en estado larval y con papilla vasta durante los siguientes tres días; realizan la gran mayoría de las actividades necesarias para el mantenimiento de la colonia (Winston, 1987).

Los zánganos presentan un cuerpo grueso y con un abdomen corto y redondeado; tienen ojos compuestos de gran tamaño que abarcan casi toda la cabeza; no poseen aguijón; su alimentación es similar a la de las obreras si bien no pueden alimentarse por sí mismos debido a la corta longitud de su glosa. Están presentes en la colmena desde el final del invierno (cuando se activa el flujo de néctar) y solo por unos pocos meses, lapso en el cual se da el apareamiento (Figura 2) (Winston, 1987).

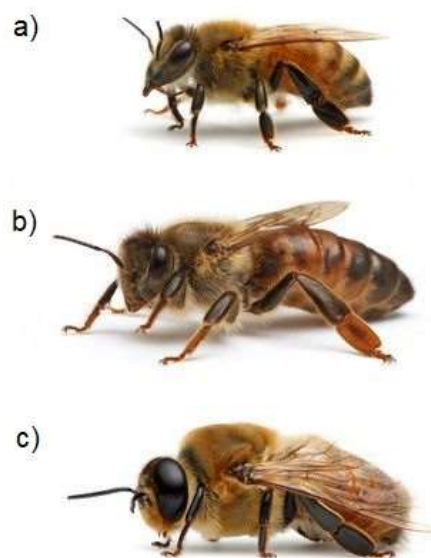


Figura 2. Castas de la especie de *Apis mellifera*. a) Abeja obrera; b) Abeja reina; c) Zángano¹

La vida de una colonia se encuentra regulada por la acción de un conjunto de feromonas (principalmente emitidas por la reina) (Free, 1987), fenómenos comportamentales y flujo de néctar. A medida que la oferta de alimento aumenta, se incrementa la postura de la reina y, por ende, el área del nido de cría, lo que lleva al

¹ Extraída de: <https://ecocolmena.com/ciclo-de-vida-de-las-abejas/>

desarrollo y crecimiento de la colonia (Delaplane y Mayer, 2000). Cuando alcanza niveles de población elevados en relación al ambiente físico que la aloja, ésta procede a dividirse, previa producción de nuevas reinas. Como consecuencia de esta situación, la reina original abandona la colonia de abejas junto con el 50-90 % de las abejas obreras para fundar una nueva colonia (Winston, 1987).

Como es característico en los insectos sociales, las colonias de abejas poseen división del trabajo ligada a la edad de los individuos: las obreras recién emergidas se encargan de la limpieza, luego pasan a alimentar y atender a la reina y a la cría. Una vez culminada esta etapa, se ocupan de la construcción del nido y las más longevas están destinadas a la colecta de polen, néctar, agua y propóleos, como así también a la defensa de la colonia ante posibles invasores (Winston, 1998). Todas estas labores están sujetas a modificación dependiendo de las necesidades de la colonia y de estímulos externos. Asimismo, la homeostasis del nido es mantenida por las obreras, las cuáles mantienen la temperatura y humedad prácticamente constante a pesar de las condiciones ambientales externas. Existen dentro de la colonia abundancia en recursos tanto proteicos (polen) como carbohidratos (miel) (Delaplane y Mayer, 2000).

Las colonias describen ciclos anuales de desarrollo, dependiendo de las condiciones ambientales y, principalmente, del flujo de néctar (Delaplane y Mayer, 2000). La subsistencia de la colonia durante todo el año está garantizada gracias a las reservas alimenticias almacenadas en las celdas de los panales, cuya recolección se produjo durante el periodo de floración. Las obreras colectan el néctar de las flores y lo transportan en su buche melario hasta la colmena; en este proceso se incorporan enzimas, antes de ser almacenado en las celdas. Mediante la deshidratación por ventilación, el néctar se transforma en miel y se opercula, para su posterior conservación. La miel, rica en carbohidratos, es la fuente de energía para la colonia (Winston, 1987).

El recurso que le proporciona proteínas, vitaminas, minerales y lípidos es el polen. Una vez recolectado por la abeja, es transportado hasta la colmena y luego del agregado de enzimas, depositado en las celdas, donde comienzan a escindirse las proteínas (Winston, 1987). La calidad nutricional del polen influye directamente sobre el estado y desarrollo de las colonias (Keller et al., 2005).

El ciclo de vida de *A. mellifera* es haplodiploide. Las hembras (reinas y obreras) se desarrollan a partir de huevos fecundados y los zánganos a partir de huevos haploides. El ciclo de vida de la abeja está compuesto por los estadios de huevo-larva-pupa y adulto, la duración de cada uno de ellos dependerá de la casta (Figura 3). El desarrollo total desde huevo a adulto de una reina requiere de 16 días, el de una obrera 21 y el de un zángano 24. Las larvas de 5 días liberan feromonas, que indican a las abejas adultas que atienden a la cría, que las celdas que las contienen deben ser operculadas (Rosenkranz et al., 2010). La reina puede sobrevivir durante varias temporadas, mientras que las obreras y zánganos usualmente viven solo unos pocos meses. Durante el invierno las obreras pueden sobrevivir más tiempo ya que las actividades dentro de la colonia son menores. En esta época del año las abejas obreras tienden a agruparse alrededor de la reina para incubar los huevos puestos en este periodo (Winston, 1987).

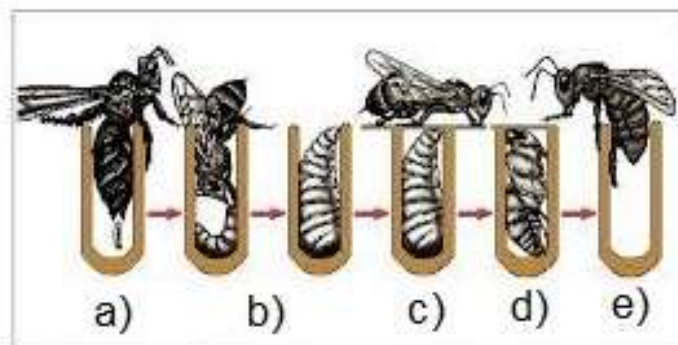


Figura 3. Desarrollo de la abeja *Apis mellifera*. a) La reina pone un huevo en el fondo de la celda; b) la larva es alimentada por una abeja obrera nodriza; c) las nodrizas operculan la celda con la larva produciéndose el cambio al estadio de pupa d); e) la abeja adulta emerge¹

1.1.2 Pérdida de colonias: introducción a la sanidad de *Apis mellifera*

Desde 1998, apicultores de diferentes regiones han informado sobre debilitamiento, despoblamiento y mortalidad de colonias. Esto se dio particularmente en Francia, Bélgica, Suiza, Alemania, Reino Unido, Países Bajos, Italia, España y Estados Unidos (Le Conte et al., 2010; Neumann y Carreck, 2010). La mayoría de los científicos están de acuerdo en que no existe una explicación única para las extensas pérdidas de colonias, pero que las interacciones entre diferentes estresores probablemente serían las causantes (Potts et al., 2010). Entre los múltiples factores que se mencionan, se incluyen la pérdida y fragmentación del hábitat, la agricultura intensiva, los monocultivos que llevan a la pérdida y reducción de recursos florales, y los parásitos (Potts et al., 2010).

Las colonias de insectos sociales ofrecen un doble atractivo para los parásitos que las afectan. Por un lado, representan una alta densidad de potenciales hospedadores y por el otro, un gran ensamblaje de individuos que poseen características genéticas

¹ Extraído de: <http://ciclodevida.net/de-las-abejas>

similares (Schmid-Hempel, 1995). Éstas son afectadas por un importante número de organismos que le ocasionan daños de distinto grado. Ácaros, virus, bacterias, hongos e insectos forman parte de una lista de agentes que producen enfermedades, depredan sobre las abejas o las parasitan (Genersch, 2010). La varroosis es actualmente la patología que representa el mayor peligro para las colonias de abejas. Es causada por el ácaro *Varroa destructor* (Anderson y Trueman, 2000), ectoparásito que afecta tanto a la abeja adulta como a la cría, razón por la cual es la patología con mayor impacto sobre el desarrollo del insecto (Potts et al., 2010; Rosenkranz et al., 2010; Levy, 2011; Martin et al., 2012). El ácaro se alimenta de los cuerpos grasos de los individuos adultos y de las larvas (Ramsey et al., 2018) y es, a su vez, vector de muchos virus que afectan a *A. mellifera* (Shen et al., 2005).

1.1.3 *Varroa destructor*

Actualmente, *V. destructor* parasita las dos especies de abejas más importantes desde el punto de vista económico: *Apis cerana* y *A. mellifera*. En sus distribuciones naturales originales, las dos especies de abejas se encontraban geográficamente separadas. *Apis cerana* ocupaba regiones del este de Asia, mientras que *A. mellifera* se localizaba fundamentalmente sobre el continente europeo y africano. Hasta mediados del siglo XX, se cree que *V. destructor* sólo parasitaba a la abeja asiática.

Debido a la mayor productividad de *A. mellifera*, durante la primera mitad del siglo XX, se trasladaron colonias desde Europa al este de Rusia. A partir de ese momento, se observó un solapamiento de ambas especies en relación a sus rangos de distribución, creando las condiciones necesarias para el avance de la parasitosis a nivel mundial (Rosenkranz et al., 2010). *Apis cerana* se encuentra muy bien adaptada a *V. destructor* debido a una larga coexistencia entre las dos especies, mientras que *A. mellifera* no es capaz de controlar efectivamente la parasitosis debido a falta de procesos co-evolutivos (Rath, 1999).

En los últimos años, uno de los factores más asociados con la masiva desaparición de colonias de *A. mellifera* ha sido el ácaro *V. destructor* (Genersch, 2010; Maggi et al., 2016).

1.1.3.1 Morfología y adaptaciones al parasitismo de *Varroa destructor*

Varroa destructor presenta diferentes adaptaciones al parasitismo. Las mismas pueden ser morfológicas (Akimov et al., 1988) o comportamentales (Donzé et al., 1996). Su cuerpo es aplanado en sentido dorso-ventral, lo cual le permite esconderse entre los tergos de las abejas. Presenta sus piezas bucales modificadas para penetrar el cuerpo de la abeja y de esta manera poder alimentarse. Sus patas terminan en uñas y ventosas, que le permiten mantenerse sujeto a su hospedador. Presenta setas (“pelos” fuertemente esclerotizados) a los costados de los bordes laterales de su cuerpo que ayudan también a la sujeción. Sus peritremas son alargados y le permiten respirar luego de sumergirse en el alimento larval cuando ingresa a las celdas de cría. Su exoesqueleto presenta una estructura molecular similar a la de *A. mellifera* lo cual le permite camuflar su olor con el de la abeja y no ser detectado por ella (Figura 4) (Nation et al., 1992).

Su ciclo de vida se ajusta al periodo de operculado de las celdas de cría de su hospedador, suprimiendo el estadio de tritoinfa para desarrollarse en un lapso de tiempo menor (Martin, 1994; 1995). En lo que respecta a las adaptaciones comportamentales, *V. destructor* es capaz de detectar señales químicas y físicas del ambiente para invadir celdas apropiadas para su reproducción. Por otro lado, dentro del ambiente cambiante de la celda de cría, producto de la metamorfosis de la abeja en desarrollo, se desarrollan cuidados parentales con el objetivo de protegerla (Donzé et al., 1996). *Varroa destructor* es capaz de detectar aquellas abejas encargadas del cuidado de la cría, lo cual favorecería su ingreso a las celdas (Le Conte y Arnold, 1988; Kraus et al., 1994).



Figura 4. Vista dorsal (a) y ventral (b) de *Varroa destructor*¹

1.1.3.2 Ciclo de vida de *Varroa destructor*

Varroa destructor es un ectoparásito obligado. En la historia de vida de la hembra, se distinguen dos fases: I) una fase forética en la cual el ácaro se encuentra sobre la abeja adulta (Figura 5) (Martin, 2001), protegido debajo de los esternitos del insecto (Fernández et al., 1993; Eguaras et al., 1995), lo que le permite transportarse a las celdas de cría para su reproducción o hacia otras colonias de abejas para su dispersión (Kuenen y Calderone, 1997); y II) una fase reproductiva en la cual se reproduce dentro de las celdas de cría de *A. mellifera* (Figura 5) (de Jong et al., 1982b; Martin, 1994; 1995). Los machos y las etapas ninfales del ácaro son de corta duración y solo se pueden encontrar dentro de las celdas de cría selladas (Kuenen y Calderone, 1997).

¹ Modificado de Anderson y Trueman (2000).



Figura 5. Ciclo simplificado del ácaro *Varroa destructor*. Las hembras de *V. destructor* tienen una fase forética y una fase reproductiva en las celdas de cría operculada. Los estadios de ninfas y los machos son de corta duración sin una fase forética fuera de las celdas¹

El ciclo reproductivo comienza cuando una hembra adulta del ácaro ingresa a una celda de cría de obrera o de zángano con larvas en su quinto día de desarrollo (obreras: día 8, zánganos: días 8-9 de desarrollo ontogenético). El ácaro se introduce en el alimento (Boot et al., 1991) y es retenido por un efecto atractivo de las larvas provenientes de sus hidrocarburos cuticulares (Rickli et al., 1994), permaneciendo inmóvil y alimentándose (Martin, 2001). Las hembras adultas de *Varroa* poseen una preferencia 10-12 veces mayor por las celdas de zánganos que por las de obreras (Fuchs, 1992; Boot et al., 1995), lo cual podría ser explicado parcialmente por el mayor tamaño de la larva de zángano (Martin, 1998). Aproximadamente 5 h después del operculado de la celda, la larva de abeja consume todo el alimento disponible (Ifantidis et al., 1988), por lo tanto, el ácaro genera una herida en la larva y comienza a alimentarse de su hemolinfa. Luego de algunas horas de que el ácaro haya ingresado a

¹ Modificado de Rosenkranz et al. (2010).

la celda comienza la ovogénesis, seguida de la vitelogénesis (Steiner et al., 1994, 1995; Garrido et al., 2000), y aproximadamente 70 h después del operculado de la misma, la hembra pone el primer huevo (Ifantidis, 1983; Steiner et al., 1994). Éste dará origen a un macho (haploide) y, subsecuentemente, cada 30 h serán colocados huevos diploides (de 4 a 5) que darán origen a hembras (Ifantidis, 1983; Rehm y Ritter, 1989; Martin, 1994; Garrido y Rosenkranz, 2003). La descendencia del parásito pasa a través de los estadios de protoninfa y deutoninfa desde que sale del huevo hasta que alcanza la madurez. Las hembras hijas se desarrollan en 5,8 días y el macho en 6,6 días luego de que es puesto el primer huevo fertilizado (Rehm y Ritter, 1989). Todas las etapas ninfales presentan un estadio móvil y uno inmóvil (proto y deuto crisálidas, según el estadio), donde la fase inmóvil es la subsiguiente a la muda (Donzé y Guerin, 1994). *Varroa* presenta dimorfismo sexual, los machos son más pequeños que las hembras y poseen patas cortas en comparación con su cuerpo (Rosenkranz et al., 2010). El macho alcanza la madurez antes que las hembras y permanece en el sitio de acumulación fecal esperando a que la primera hembra alcance la madurez. La reproducción siempre se lleva a cabo dentro de la celda, siendo común la cópula entre hermanos ocurre (Donzé et al., 1996).

La reproducción de *Varroa* puede verse afectada por diferentes factores tales como las condiciones climáticas (de Jong et al., 1984; Ritter y de Jong, 1984), la raza de abeja (Moretto et al., 1991; Correa-Marques et al., 2002), la infertilidad de las hembras de *Varroa* (Correa-Marques et al., 2003), la ausencia de la reina (de Jong, 1981) y la tasa de remoción de parásitos por parte de la abeja (Correa-Marques y de Jong, 1998). La duración del periodo de operculado de las celdas de cría también afecta el número de descendientes producidos por una hembra. El periodo de operculado de las celdas de zánganos es dos días mayor en comparación al de las celdas de obreras (Winston, 1987). Consecuentemente, tres ácaros pueden alcanzar la madurez en celdas de

zángano y 1,8 en celdas de obrera (Donze et al., 1996). Estos valores fluctúan dependiendo de la subespecie de abeja.

1.1.3.3 Daños ocasionados por *Varroa destructor*

Pueden diferenciarse dos tipos de daños ocasionados en el hospedador: los directos, atribuidos al hábito alimentario del ácaro *per se* y los indirectos, ocasionados por su interacción con otros parásitos y patógenos.

Los daños directos ocasionados en *A. mellifera* impactan de distintas formas, siendo las larvas y las pupas los estadios más sensibles. La alimentación del ácaro durante el desarrollo de la larva en la celda de cría produce una disminución significativa del peso de la abeja emergida. Si bien dicha disminución dependerá del número de hembras fundadoras y del número de los ácaros hijos, una sola infestación resultará en una pérdida promedio de peso corporal de 7% del individuo hospedador (de Jong et al., 1982b; Schatton-Gadelmayer y Engels, 1988). Esto también ha sido observado para zánganos parasitados, perdiendo un 11-19% de su peso corporal dependiendo de la tasa de infestación (Duay et al., 2003), lo que, a su vez, lleva a la disminución del rendimiento de vuelo (Duay et al., 2002). Cuando la intensidad parasitaria es alta en el interior de las celdas de cría, las abejas emergentes presentan diversos tipos de malformaciones (Figura 6). Las más comunes se presentan en las alas (Daly et al., 1988; Koch y Ritter, 1991), patas (disminución del número de artejos) y abdomen (acortamiento) (de Jong et al., 1982b). Las abejas obreras que han sido parasitadas durante su desarrollo comienzan antes a realizar tareas de pecoreo y tienen una menor longevidad (de Jong et al., 1982b; Schneider y Drescher, 1987; Amdam et al., 2004). Asimismo, las abejas pecoreadoras parasitadas muestran una capacidad disminuida de aprendizaje no asociativo, prolongadas ausencias de la colonia y una reducida tasa de retorno a la misma (Kralj y Fuchs, 2006; Kralj et al., 2007).



Figura 6. Abeja recién emergida con alas deformes y el abdomen acortado, probablemente debido a la infección por *Varroa* y Virus de las Alas Deformadas (DWV) durante la etapa del desarrollo¹

A nivel poblacional, la capacidad reproductiva de una colonia de abejas infestada puede verse reducida, debido a que zánganos parasitados durante su desarrollo presentan chances de aparearse significativamente menores y a que la producción de enjambres es menor en comparación a la de colonias libres de *V. destructor* (Villa et al., 2008). De acuerdo a la zona geográfica donde se encuentren las colmenas, existen diferentes umbrales de parasitismo a partir de los cuales los efectos ocasionados en la colonia generan daños irreparables (Eguaras y Ruffinengo, 2006). Colonias con elevados niveles de infestación presentan síntomas conocidos como “síndrome parasítico del ácaro”, expresado en un mal estado de la cría, abejas adultas afectadas físicamente y reducción de su población (Shimanuki et al., 1994). El umbral de daño no

¹ Extraído de Rosenkranz et al. (2010)

se encuentra determinado por un número fijo de ácaros por colonia, sino que es variable y depende del número de abejas, época y presencia de otras patologías asociadas a *Varroa* (Delaplane y Hood, 1999; Liebig, 2001; Currie y Gatién, 2006).

En lo que respecta a los daños indirectos causados por el ácaro, *V. destructor* es responsable de inocular una amplia variedad de microorganismos mediante los procesos de alimentación. Hasta la fecha, varias especies de virus han sido aisladas de colonias de abejas (Chen y Siede, 2007) y la mayoría de ellas son vectorizadas por *Varroa*. En ausencia del ácaro, la mayoría los virus no son considerados un problema sanitario importante para *A. mellifera* (Allen et al., 1986; Bailey y Ball, 1991; Bowen-Walker et al., 1999; Yue y Genersch, 2005). No obstante, se ha determinado que existen diferentes tipos de virus presentes en sus colonias en forma latente, que se vuelven infectivos cuando se asocian con altas tasas de infestación de ácaros (Bailey et al., 1980; Ball, 1985, 1988; 1989; Ball y Allen, 1988). Adicionalmente, *V. destructor* puede inducir la inmunosupresión de su hospedador, lo cual potenciaría las infecciones de los virus (Yang y Cox-Foster, 2007). Existen evidencias, además, de que *V. destructor* crea dentro de una colmena las condiciones ideales para el desarrollo del hongo patógeno *Ascosphaera apis*, agente causal de la cría yesificada (Puerta et al., 1990) y de que el ácaro es capaz de transportar sobre su cuerpo esporas de *Paenibacillus larvae*, aunque no queda claro aún si esta carga esporal es suficiente para que se desarrolle la loque americana en colonias sanas (Alippi et al., 1995; De Rycke et al., 2002). Diferentes estudios hipotetizaron que las recientes pérdidas de colmenas en Europa y USA serían la consecuencia de los efectos sinérgicos producidos por la conjunción de las parasitosis de *V. destructor* y del microsporidio *Nosema ceranae* (Cox-Foster et al., 2007; Anderson y East, 2008; Higes et al., 2008; Ribière et al., 2008).

1.1.3.4 Control de *Varroa destructor*

Debido a la falta de mecanismos reguladores de las poblaciones de *V. destructor* por parte de *A. mellifera* (Peng et al., 1987), éstas deben ser controladas mediante el uso de acaricidas para mantener la salud de las colonias de abejas. En los inicios de esta parasitosis en Europa y en América se mencionaba un ciclo de tres años hasta ocasionar la muerte de las colonias (Ritter, 1981); actualmente se considera que si las mismas no reciben un tratamiento acaricida mueren en el transcurso del primer año (Maggi et al., 2016).

Históricamente, los productores utilizaron para el control de *V. destructor* acaricidas sintéticos. En los últimos 25 años, los más conocidos son el organofosforado cumafós, los piretroides *tau*-fluvalinato y flumetrina, y la formamidina Amitraz (Figura 7) (Milani y Barbattini, 1988; Milani y Lob, 1998; Ritter, 1988). Los piretroides actúan activando los canales de voltaje de sodio de las células nerviosas, mientras que el cumafós es un inhibidor de la acetilcolinesterasa e interfiere en la señalización nerviosa (Rosenkranz et al., 2010).

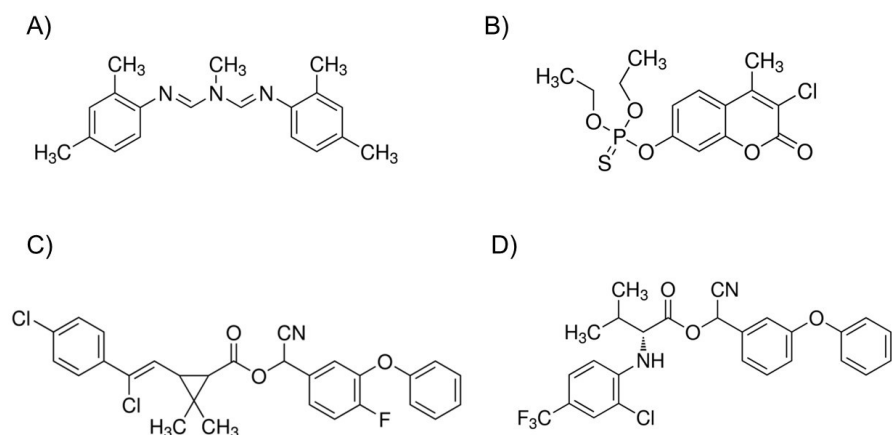


Figura 7. Estructura química de los acaricidas de síntesis A) amitraz; B) cumafós; C) flumetrina; D) *tau*-fluvalinato.

Los compuestos naturales, a su vez, representan una alternativa válida y una herramienta útil para ser incorporada en un programa de Manejo Integrado de Plagas que permita la rotación de los acaricidas de síntesis ya existentes y se minimice su uso. Ellos presentan una baja toxicidad en mamíferos, un escaso impacto ambiental y muy buena aceptación pública (Isman, 2000). Varios de estos compuestos naturales muestran efectos sobre ácaros parásitos de abejas, especialmente los ácidos orgánicos y algunos aceites esenciales (Imdorf et al., 1999; Lindberg et al., 2000; Eguaras et al., 2001; 2005; Ruffinengo et al., 2005; Damiani et al., 2009). Si bien han demostrado ser efectivos en ensayos *in vitro*, muestran una marcada variabilidad en su eficacia final cuando son aplicados en el interior de las colmenas y no han sido exitosos a la hora de controlar a *V. destructor* (Rickli et al., 1991; Mutinelli et al., 1994; Imdorf et al., 1999; Flamini, 2003). Esto, sumado a sus elevados precios en comparación con los acaricidas tradicionales conllevó (y conlleva en la actualidad) a la elección de los acaricidas de síntesis por la mayoría de los productores apícolas. Algunas de las ventajas que tienen los acaricidas de síntesis y que los hacen los más elegidos por los apicultores en Argentina son: la mayoría de estos productos son fáciles de aplicar, económicamente convenientes y no requieren tener un conocimiento refinado de la biología de los ácaros. Además, como se trata de sustancias lipofílicas, son absorbidas rápidamente por la cera de abejas, son persistentes, estables, y se acumulan luego de repetidos tratamientos (Bogdanov et al., 1998; Wallner, 1999). Entre las principales desventajas que presentan compuestos se pueden mencionar: pueden ocasionar daños a las abejas cuando las mismas se exponen simultáneamente a múltiples compuestos almacenados en cera (Chauzat et al., 2009; Johnson et al., 2009), pueden contaminar de forma sostenible la miel y otros productos de la colmena (Nasr y Wallner, 2003; Schroeder et al., 2004; Martel et al., 2007; Lodesani et al., 2008) dicha contaminación incluso persiste a través del reciclaje comercial (Medici et al., 2016), la alta probabilidad de favorecer al desarrollo de poblaciones resistentes debido a su uso, que se discutirán en detalle en la siguiente sección.

1.1.3.5 Resistencia a acaricidas de síntesis

La resistencia a *tau*-fluvalinato fue reportada por primera vez en Italia, en el año 1991 (Loglio y Plebani, 1992; Lodesani et al., 1995;) y los registros se extendieron luego hacia otros lugares como Francia, Estados Unidos, Israel y el Reino Unido (Vandame et al., 1995; Elzen et al., 1998, 1999; Mozes-Koch et al., 2000; Spreacifco et al., 2001; Thompson et al., 2002;). Los fenómenos de resistencia cruzada, en el cual los individuos desarrollan resistencia a más de un compuesto, ya sea principios activos de la misma o distinta clases química, pero que presentan un modo de acción similar (Eguaras y Ruffiengo, 2006), también se han detectado en poblaciones de *V. destructor*, entre los piretroides flumetrina y *tau*-fluvalinato (Milani, 1995; Floris et al., 2001; Thompson et al., 2002). En las áreas donde estos procesos fueron identificados, se comenzó a implementar el uso de métodos alternativos como el cumafós y el amitraz (Elzen et al., 2000; Elzen y Westervelt, 2002). Sin embargo, al igual que lo ocurrido con los piretroides, se generó nuevamente un intenso y abusivo uso de estas moléculas para el control de *Varroa*, reportándose evidencias de resistencia en Estados Unidos, México y Europa (Elzen et al., 1999; Mathieu y Faucon, 2000; Rodríguez-Dehaibes et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente, los acaricidas producen efectos negativos en las abejas. Dosis agudas pueden matar colonias completas (Atkins, 1992; Johnson et al., 2010), mientras que la exposición crónica a bajas dosis conduce a efectos subletales en abejas individuales, lo cual, a su vez, también puede dar como resultado efectos a nivel colonial (Thompson y Maus, 2007; Johnson et al., 2010;). Se han demostrado efectos subletales de cumafós y *tau*-fluvalinato en las tres castas (reinas, obreras y zánganos). La exposición al cumafós y/o al *tau*-fluvalinato puede reducir el aprendizaje, la memoria y la orientación de abejas obreras adultas (Frost et al., 2013; Williamson y Wright, 2013), alterar el comportamiento de alimentación y locomoción (Teeters et al., 2012), así como reducir la longevidad de las larvas (Wu et al., 2011; Zhu et al., 2014). En los zánganos, la exposición al cumafós y/o *tau*-fluvalinato reduce el peso corporal, la longevidad

(Rinderer et al., 1999) y la viabilidad del esperma (Burley et al., 2008), lo cual probablemente tiene efectos en una baja calidad de apareamiento con la reina. La exposición al cumafós y/o *tau*-fluvalinato durante el desarrollo de las reinas reduce el peso de la reina adulta (Haarmann et al., 2002; Pettis et al., 2004), la cantidad de esperma almacenado (Haarmann et al., 2002), la tasa de oviposición (Collins et al., 2004; Haarmann et al., 2002), e interrumpe la activación de los ovarios (Haarmann et al., 2002).

1.2 Objetivo general

La problemática generada por *V. destructor* abarca dos grandes cuestiones, la primera debido al daño que produce a las abejas (parasitismo propiamente dicho), y la segunda, ocasionada por el uso y abuso de los acaricidas utilizados en su control (fenómenos de resistencia, generación de residuos, toxicidad en abejas). En este contexto, los objetivos generales de la presente Tesis Doctoral fueron I) analizar potenciales casos de resistencia a acaricidas de síntesis y en caso de ser confirmados, estudiar los posibles mecanismos que le dan origen y II) evaluar los efectos de la suplementación dietaria con moléculas de origen vegetal como estrategia de mitigación de los daños colaterales ocasionados en *A. mellifera* por los acaricidas de síntesis.

Capítulo II



Estudio de la resistencia a acaricidas de síntesis en *Varroa destructor*



2 Capítulo II

2.1 Introducción

En Argentina, existen diferentes formulaciones acaricidas comerciales disponibles para los apicultores, basadas en los principios activos cumafós, amitraz, *tau*-fluvalinato y flumetrina. Inicialmente, las mismas han demostrado ser eficaces en el control de *V. destructor* (Marcángeli et al., 2004, 2005). Sin embargo, en los últimos años se ha observado una baja en la eficacia de los productos (generalmente atribuibles a déficits en las formulaciones comerciales y falta de controles). En algunas situaciones, se observaron casos en los que se han visto altos niveles de infestación de *V. destructor* luego de que las colonias de abejas reciban tratamientos acaricidas con algunos de los principios activos de síntesis (Eguaras y Ruffinengo, 2006). Esta situación generalmente es atribuida a fenómenos de resistencia, aunque la aseveración de estos fenómenos sin la realización de bioensayos que confirmen lo observado en campo, puede generar conclusiones erróneas (Maggi, 2010). Estudios llevados a cabo por Maggi et al. (2008), permitieron desarrollar una metodología de laboratorio que permite evaluar la susceptibilidad a acaricidas de síntesis por contacto con los principios activos. La misma, consiste en la aplicación de concentraciones crecientes del acaricida en estudio. En base a los porcentajes de mortalidad de ácaros en las distintas concentraciones, se estima la concentración que es letal para el 50% de los individuos expuestos (CL_{50}) y los límites de confianza al 95%. Usando dicha metodología, en 2008 se realizaron los primeros estudios para determinar las líneas de base de los cuatro acaricidas de síntesis en Argentina (Maggi et al., 2008), datos esenciales para comparar y detectar poblaciones de ácaros resistentes. Posteriormente se analizaron muestras de ácaros procedentes de colmenas en las que se observaron fallas de los tratamientos (altos niveles de infestación de *V. destructor* luego de que las colmenas reciban tratamiento con formulaciones acaricidas comerciales). De esta manera se detectó el primer caso

de resistencia a cumafós en la provincia de Entre Ríos (Maggi et al., 2009), y posteriormente resistencia a amitraz en la provincia de Santa Fe (Maggi et al., 2010).

Uruguay posee una apicultura en vías de marcado desarrollo en los últimos años (Errea y Licandro, 2009), aunque su situación sanitaria es similar a la registrada en Argentina. Maggi et al. (2011) detectaron resistencia a cumafós en apiarios de diferentes localidades del departamento de Colonia, en los que se había aplicado un esquema de rotación de acaricidas. El estudio del estado de susceptibilidad de las poblaciones de ácaros en Uruguay a los acaricidas de síntesis provee una herramienta de suma importancia para comparar los niveles de susceptibilidad de las poblaciones de ácaros localizadas en Argentina. Por otro lado, la detección de poblaciones de ácaros resistentes en Uruguay podría alertar a las autoridades gubernamentales argentinas sobre los riesgos de la importación de material vivo desde zonas con focos de resistencia o cercanas a éstas. La dispersión de poblaciones de ácaros resistentes de una zona a otra es una opción factible de ocurrir (Martin, 2004).

Una de las hipótesis que explica la rápida propagación de la resistencia a piretroides indica que la resistencia habría surgido solo una o dos veces y que la principal causa sería el movimiento de colmenas parasitadas por parte de los apicultores (Martin, 2004). Los factores asociados al desarrollo de la resistencia son: 1) reinfestación debido a la presencia de poblaciones resistentes cercanas al apiario en cuestión (Greatti et al., 1992; Sammataro et al., 2005); 2) el abuso o mal uso de un acaricida, que puede llevar a la selección de individuos resistentes y la subsecuente propagación al resto de la población (Maggi et al., 2011); 3) el intenso y continuo contacto con dosis subletales de acaricida presentes en cera, que por contaminación de la misma puede ejercer una presión de selección sobre los individuos resistentes (Onstad, 2008; Medici et al., 2016).

Como se ha visto en otras plagas agrícolas que han desarrollado resistencia, el cese del uso del compuesto durante un periodo de tiempo puede conducir a una reversión de la resistencia, es decir, a una disminución en la frecuencia de individuos resistentes (Georghiou y Taylor, 1986). La reversión de la resistencia a *tau*-fluvalinato se observó

en poblaciones de *V. destructor* de varias localidades de Italia, que no estuvieron en contacto con dicho acaricida durante cuatro años (Milani y Della Vedova, 2002).

2.1.1 *Objetivos Particulares*

1. Determinar diferentes niveles de susceptibilidad en poblaciones de *V. destructor* a flumetrina, *tau*-fluvalinato, amitraz y cumafós, en poblaciones de Argentina y Uruguay.
2. Determinar los índices de resistencia (IR) en los casos en que se detecte resistencia a los acaricidas de síntesis.
3. Determinar la posible ocurrencia de la reversión de la resistencia en una población de ácaros no controlada con cumafós durante un periodo de tiempo de siete años.
4. Determinar la ocurrencia o no de resistencia cruzada entre *tau*-fluvalinato y flumetrina en poblaciones de *V. destructor*.

2.1.2 *Hipótesis*

H1: En los apiarios en los que se realiza un manejo que incluye rotación de acaricidas, las poblaciones de *V. destructor* son susceptibles a los mismos.

A partir de la H1 se predice que las poblaciones de *V. destructor* de los apiarios de Colonia (Uruguay) y Mar del Plata (Argentina) serían susceptibles a la flumetrina debido al manejo de rotación de acaricidas que se utilizó en los últimos años.

H2: Luego de que una población de ácaros resistente a un acaricida no está expuesta al mismo durante un periodo de tiempo, se produce la reversión de la resistencia a dicho compuesto.

A partir de la H2 se predice que, en el apiario experimental de Mar del Plata, las poblaciones de ácaros poseerían elevada susceptibilidad al cumafós debido a que el acaricida ha dejado de utilizarse desde el 2010.

H3: Existe resistencia cruzada entre la flumetrina y el *tau*-fluvalinato por pertenecer a la misma familia de acaricidas.

A partir de la H3 se predice que aquellas poblaciones de ácaros con altas presiones de selección impuestas por el uso prolongado de flumetrina podrían no ser susceptibles al *tau*-fluvalinato.

2.2 Materiales y métodos

Los estudios en Argentina fueron realizados en el apiario experimental del Centro de Investigación de Abejas Sociales (CIAS) ubicada en el barrio Santa Paula, (km 10 de la ruta 226, 37° 56' 0.69" S; 57° 40' 40.53" O) y en el Laboratorio de Artrópodos del CIAS ubicado en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, ambos pertenecientes a la Universidad Nacional de Mar del Plata. La experimental apícola se encuentra adherida al Sistema Nacional de Bioterios acreditado por resolución 2018-26-APN-SECACT. Los estudios análogos realizados en Uruguay fueron llevados a cabo en el Laboratorio de La Estanzuela, INIA, localizado en el departamento de Colonia. Los estudios comprendieron el periodo abarcado entre el año 2014 y el año 2017.

2.2.1 Toma de muestras de las poblaciones de ácaros

2.2.1.1 Uruguay

Los especímenes de *V. destructor* fueron obtenidos en diferentes apiarios ubicados en los departamentos de Colonia, Treinta y Tres, y San José, Uruguay (Figura 8). Los apiarios fueron seleccionados por contar con las siguientes características: 1) apiario potencialmente resistente a la flumetrina en Colonia, en el cual se detectaron fallas en el tratamiento sanitario a campo con dicho piretroide 2) apiario potencialmente susceptible en San José, en el cual se aplicó un esquema de rotación de acaricidas para controlar los niveles de *V. destructor* con eficacias superiores al 95%; 3) apiario potencialmente susceptible en Treinta y Tres, en el cual nunca se aplicaron acaricidas de síntesis. Se obtuvieron los registros disponibles acerca de los acaricidas utilizados

en cada uno de los apiarios, con el fin de conocer los manejos sanitarios llevados a cabo.



Figura 8. Localización geográfica de los apiarios de Uruguay en estudio donde los individuos de *V. destructor* fueron obtenidos para los bioensayos. El triángulo negro representa el apiario del departamento de Colonia, con la población de ácaros potencialmente resistente a la flumetrina ($34^{\circ} 20' 23.72''$ S - $57^{\circ} 41' 39.48''$ O); los círculos negros representan los apiarios con poblaciones de ácaros potencialmente susceptibles, en el departamento de San José ($34^{\circ} 25' 31.37''$ S - $57^{\circ} 08' 58.7''$ O), y en el departamento de Treinta y Tres ($33^{\circ} 15' 22.54''$ S - $54^{\circ} 25' 35.63''$ O) ().

2.2.1.2 Argentina

Los especímenes de *V. destructor* fueron obtenidos del apiario experimental localizado en el Barrio Santa Paula, Mar del Plata, Argentina [Ruta Nacional 226, km 10, ($37^{\circ} 56' 0.69''$ S; $57^{\circ} 40' 40.53''$ O)]. Para los estudios con cumafós los muestreos se realizaron en los siguientes momentos: abril de 2014, abril de 2016, diciembre de 2016 y abril de 2017. Los muestreos para los estudios con amitraz se realizaron en abril de

2014 y para los estudios con *tau*-fluvalinato y flumetrina en abril de 2018. Los experimentos realizados durante el mes de abril se llevaron a cabo antes de los tratamientos con acaricidas. El apiario fue seleccionado por encontrarse en un área de uso intensivo de cumafós hasta el año 2011; en los últimos siete años se aplicó un esquema de rotación de acaricidas que no incluyó al mismo.

2.2.2 Obtención de ácaros

Se extrajeron cuadros con cría operculada de colmenas con niveles de infestación de *V. destructor* en foresis mayores al 5% (al menos dos cuadros de cada colmena, un mínimo de cinco colmenas). Las infestaciones se estimaron según el método de de Jong et al. (1982a). En el laboratorio se procedió al desoperculado de celdas en forma manual, utilizando pinzas de disección y pinceles. En los casos en los que se encontraron hembras adultas de *V. destructor*, éstas fueron separadas utilizando un pincel y ubicadas en cápsulas de Petri (90 × 20 mm) a 30-32 °C y 70% de humedad relativa (HR). Se agregaron larvas de abeja en el interior de las cápsulas como fuente de alimento, durante 1-3 h hasta que el número de ácaros recolectado fue suficiente para el desarrollo de los bioensayos. Al llevar a cabo los mismos, no se tuvo en cuenta el estadio de cría de abeja a partir del cual fueron extraídos los parásitos, debido a que Milani (1995) demostró que dicho factor no afecta la variabilidad de los resultados obtenidos en los bioensayos.

2.2.3 Bioensayos

Una vez obtenidos los ácaros, se procedieron a determinar los valores de CL₅₀ para las poblaciones en estudio, utilizando el método de toxicidad descrito por Maggi et al. (2008) (Figura 9). Mediante la implementación de este bioensayo, los ácaros y las abejas entran en contacto simultáneamente con el acaricida. El método consiste en la aplicación de concentraciones crecientes del acaricida en estudio. En base a los

porcentajes de mortalidad de ácaros en las distintas concentraciones, se estima el valor de CL₅₀ y los límites de confianza al 95%. Este valor, en comparación con valores de CL₅₀ de base en poblaciones de ácaros susceptibles, permite establecer el grado de susceptibilidad de la misma al acaricida en cuestión. Los tratamientos se realizaron en cápsulas de Petri de 90 x 20 mm. Se diluyeron flumetrina o *tau*-fluvalinato de grado analítico (para los estudios con las poblaciones de Uruguay) y cumafós, amitraz y flumetrina (para los estudios con la población de Argentina) (Pestanal®; Sigma Aldrich) en hexano (Laboratorio Cicarelli, Argentina, Pro-análisis) para la obtención de la solución madre y a partir de diluciones se obtuvieron las diferentes concentraciones a testear. De este modo fueron preparadas concentraciones crecientes para cada acaricida, que variaron de 0 (control, 1 ml de hexano) a 2 µg/ml, en el caso de las poblaciones susceptibles y de 0 a 20 µg/ml, en el caso de las poblaciones de ácaros sospechosas de presentar resistencia a acaricidas.

Las concentraciones ensayadas fueron aplicadas homogéneamente sobre la superficie interna de las cápsulas de Petri. Luego de preparar la totalidad de los tratamientos, las cápsulas fueron mantenidas abiertas a temperatura ambiente durante el tiempo suficiente como para evaporar los residuos de hexano. Una vez que el solvente se evaporó, fueron colocadas cinco hembras de *V. destructor* por cápsula de Petri. Una hora después de colocar los ácaros, fueron adicionadas tres abejas obreras y un recipiente con *candy* (alimento para las abejas preparado con tres partes de azúcar impalpable y una de agua) y una esponja (1 x 1 x 0,5 cm) embebida en agua, que funcionó de bebedero para las abejas (Figura 9). Durante el tiempo que abarcaron los bioensayos, las cápsulas de Petri fueron mantenidas a 29-30°C y 61.5% HR. La toxicidad fue estimada para cada concentración de acaricida y para los controles, utilizando cinco réplicas por tratamiento, de manera de tener un total de 25 ácaros expuestos a cada concentración ensayada.

Cuando no se contó con el número suficiente de ácaros para estimar la toxicidad del acaricida en concentraciones crecientes del mismo, debido a un bajo porcentaje de

infestación de las colmenas, como fue para el caso del ensayo con *tau*-fluvalinato en las poblaciones de ácaros de Argentina, se evaluó la mortalidad de los ácaros al ser expuestos a la CL₅₀ de base del acaricida objeto de estudio reportada por Maggi et al. (2008). De este modo la respectiva CL₅₀ aplicada actuó como concentración discriminatoria para establecer susceptibilidad o resistencia sobre las poblaciones de ácaros estudiadas. A modo de ejemplificar la interpretación de los resultados: si se aplica la CL₅₀ de un acaricida sobre 100 ácaros y estos son susceptibles, se espera obtener un 50 % de mortalidad.

La mortalidad de los ácaros fue cuantificada a las 24h de iniciados los bioensayos, mediante la utilización de una lupa (modelo Leitz Wetzlar). Al finalizar los experimentos, un espécimen fue considerado muerto si no presentó movimientos luego de ser expuesto a estímulos táctiles generados por el roce de un pincel. Los ácaros perdidos o muertos accidentalmente durante los bioensayos fueron excluidos de los conteos finales.

Para el caso de los bioensayos realizados en el apiario de Argentina para cumafós, los ácaros que sobrevivieron en los tratamientos y el control fueron puestos en tubos eppendorf en 0,2 ml de TRIzol® (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, USA) y almacenados a -20°C para análisis de expresión génica (ver capítulo III, estudios de expresión génica).



Figura 9. Método de toxicidad (Maggi et al., 2008). En interior de la cápsula de Petri se pueden visualizar los ácaros que entran en contacto con el acaricida aplicado previamente de manera homogénea en la base de la cápsula. También pueden observarse las abejas que se agregan para que los ácaros se alimenten y el recipiente que contiene la goma espuma embebida en agua y el *candy*.

2.2.4 Análisis estadísticos

La estimación de los valores de CL_{50} y los límites de confianza al 95% para los mismos fueron realizados mediante el uso del software EPA (versión 1.5) según lo establecido por USEPA (1986). Mediante el empleo de este programa, fueron ajustados los valores de mortalidad de acuerdo con Abbott (1925) en función de la mortalidad natural registrada en los controles. El índice de resistencia (IR) para las poblaciones de *V. destructor* resistentes se calculó de la siguiente manera: $IR = CL_{50} \text{ de ácaros resistentes} / CL_{50} \text{ de ácaros susceptibles}$.

En los casos donde sólo fue aplicada una única concentración (CL_{50} de base) por no contar con el número de ácaros suficientes, el valor de mortalidad obtenido (expresado

en porcentaje) se comparó con el valor de mortalidad esperado (50%) mediante el empleo de un test de Chi-cuadrado.

Para el estudio realizado en el apiario de Santa Paula con cumafós, los valores de CL_{50} obtenidos para los distintos años fueron analizados mediante *Kendall's tau-b*, para poder establecer el coeficiente de correlación entre el tiempo transcurrido y el valor de CL_{50} . Dicho test permite tener una medida de la fuerza y dirección de la asociación que existe entre dos variables continuas, es un método no paramétrico alternativo a *Spearman rank-order correlation coefficient*, que se utiliza en situaciones en las que se tiene un tamaño de muestra pequeño (Kendall, 1938).

Además, el porcentaje de mortalidad para cada concentración de acaricida de los distintos ensayos realizados en diferentes años fue comparado a través del test Chi-cuadrado mediante el programa InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al. 2017).

2.3 Resultados

2.3.1 Bioensayos en poblaciones de Uruguay

Los acaricidas usados para los tratamientos de los apiarios en estudio se muestran en la Tabla 1. Los ácaros de Treinta y Tres nunca estuvieron expuestos a curas con acaricidas de síntesis. Los porcentajes de mortalidad para cada concentración de flumetrina y los controles para las tres poblaciones de estudio se muestran en la Tabla 2. En la Tabla 3 se muestran los porcentajes de mortalidad para las concentraciones de *tau*-fluvalinato ensayadas en las poblaciones de ácaros de Colonia.

Tabla 1. Historia de acaricidas utilizados en los apiarios de estudio. Los tratamientos fueron aplicados en otoño. Los ácaros de Treinta y Tres nunca fueron expuestos a acaricidas.

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Apiario Departamento Colonia	Flumetrina FD	Cumafós	Amitraz	Flumetrina	Amitraz	Flumetrina FD	Amitraz	-
Apiario Departamento San José	Cumafós	Cumafós	Cumafós	Amitraz	Flumetrina	Amitraz	Flumetrina Ácido oxálico (primavera)	Amitraz
Apiario Departamento Treinta y Tres	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: **FD**: Fallas detectadas en el tratamiento con flumetrina para el control de *Varroa*.

Tabla 2. Mortalidad de ácaros (%) luego de 24 h de aplicación de flumetrina.

Origen	Concentración de flumetrina (µg/cápsula de Petri)								
	0.25	0.5	1	2	2.5	5	10	20	Control
Apiario de Treinta y Tres	40	84	84	100	-	-	-	-	24
Apiario de San José	80	88	92	100	-	-	-	-	20
Apiario de Colonia	-	-	-	-	37	62	98	100	10

Tabla 3. Mortalidad de ácaros (%) luego de 24 h de aplicación de *tau*-fluvalinato.

Origen	Concentración de <i>tau</i> -fluvalinato (µg/cápsula de Petri)				
	2.5	5	10	20	Control
Apiario de Colonia	96	100	100	100	10

Los valores de CL₅₀ de flumetrina obtenidos para las poblaciones estudiadas se muestran en la Tabla 4. El valor de CL₅₀ de flumetrina para los ácaros del apiario de Treinta y Tres fue de 0,11 µg/cápsula de Petri mientras que la CL₅₀ de los ácaros de San José fue de 0,36 µg/cápsula e Petri. Los ácaros de Colonia tuvieron un valor de CL₅₀ de 3,8 µg/cápsula de Petri, lo que significa un incremento de 34,5 veces al comparar con el valor de CL₅₀ de Treinta y Tres y de 10,6 veces al comparar con el valor de CL₅₀ de San José. A su vez, no fue posible determinar el valor de CL₅₀ para el *tau*-fluvalinato en los ácaros del apiario de Colonia, debido a la alta mortalidad registrada a la menor concentración ensayada (2,5 µg/cápsula de Petri).

Tabla 4. CL₅₀ e intervalos de confianza del 95% estimados para la flumetrina en las poblaciones de estudio.

Origen ácaros	CL ₅₀ µg/cápsula de Petri	intervalo de 95% de confianza	Índice de resistencia	Susceptibilidad a la flumetrina
Apiario Departamento Treinta y Tres (A)	0.11 ^a	0.0001-0.25	-	Susceptible- (población nunca expuesta a acaricidas de síntesis)
Apiario Departamento San José (B)	0.36 ^a	0.21-0.49	-	Susceptible
Apiario Departamento Colonia (C)	3.8 ^b	3.1-4.5	34.5 (C/A)* 10.5 (C/B)	Resistente

Nota: Letras diferentes indican diferencias significativas entre CL₅₀ ($X^2= 3.84$ con d.f. = 1 y $\alpha = 0.005$).

* El índice de resistencia (IR) se calculó para las poblaciones de *V. destructor* resistentes de la siguiente manera: IR = CL₅₀ de ácaros resistentes / CL₅₀ de ácaros susceptibles (Al lado de cada población se indica la letra asignada)

2.3.2 Bioensayos en población de Argentina

En la Tabla 5 se muestra la historia de acaricidas utilizados en los últimos años para la cura contra *V. destructor*. Los porcentajes de mortalidad de ácaros de los diferentes ensayos realizados se muestran en la Tabla 6. Se puede observar que en el año 2014

el porcentaje de mortalidad de ácaros fue bajo, incluso a la mayor concentración de cumafós ensayada. La mortalidad fue estadísticamente equivalente al comparar los bioensayos realizados a lo largo de los años ($p > 0.05$).

A su vez, se puede observar que tanto los ácaros expuestos a flumetrina y amitraz tuvieron valores altos de mortalidad, indicando la susceptibilidad de los ácaros a dichos acaricidas (Tabla 7).

Tabla 5. Historia de acaricidas usados para las curas en el Apiario de Santa Paula. Todos los tratamientos fueron aplicados en otoño (mes de marzo)

2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Cumafós FD									
Amitraz	Flumetrina	Amitraz	Flumetrina	Amitraz	Flumetrina	Amitraz	Flumetrina	Ac oxálico	Ac oxálico

Nota: **FD**: Fallas detectadas en el tratamiento con cumafós, población resistente (Maggi, 2010).

Tabla 6. Mortalidad de ácaros (%) luego de 24 h de exposición a diferentes concentraciones de cumafós en ensayos realizados en los diferentes años.

Fecha del ensayo	Concentración de cumafós (µg/cápsula de Petri)							Control
	0,25	0,5	1	2	5	10	20	
Abril 2014	48	56	44	48	-	-	-	0
Abril 2016	21	44	60	71	-	-	-	20
Diciembre 2016	16	46	32	64	64	79	-	18
Abril 2017	-	-	28	-	58	69	88	12

Tabla 7. Mortalidad de ácaros (%) luego de 24 h de exposición a diferentes concentraciones de amitraz, flumetrina o *tau*-fluvalinato

Acaricidas	Concentración de acaricida (µg/cápsula de Petri)					
	0,25	0,29	0,5	1	2	Control
amitraz	100	-	100	100	100	0
flumetrina	84	-	92	92	96	16
<i>tau</i> -fluvalinato	-	84	-	-	-	16

La Tabla 8 muestra los valores de CL₅₀ del cumafós y los intervalos de confianza de los bioensayos realizados en los diferentes años. El valor de CL₅₀ del cumafós, en el ensayo de abril de 2016, fue de 1,14 µg/cápsula de Petri, mientras que para el ensayo de abril de 2017 el valor de CL₅₀ del cumafós fue de 4,58 µg/cápsula de Petri. La comparación de los valores de CL₅₀ obtenidos en el presente estudio con el valor de referencia de línea de base del cumafós obtenido por Maggi et al. (2008) reveló un aumento de 2 a 8 veces entre los diferentes años.

Se observó una correlación positiva entre los valores de CL₅₀ del cumafós y el tiempo en el cual se fueron realizando los ensayos (correlación= 0.83; Kendall's Tau-b valor p: 0.04154), demostrando que la CL₅₀ del cumafós se fue incrementando a lo largo del tiempo en la población de *Varroa* en estudio.

No fue posible estimar los valores de CL₅₀ del amitraz y flumetrina (< 0,25 µg/cápsula de Petri) debido a que se registró una elevada mortalidad en todas las concentraciones ensayadas.

Tabla 8. CL₅₀ e intervalos de confianza al 95% estimados para los diferentes bioensayos realizados con cumafós en *V. destructor*.

Fecha del experimento	CL ₅₀ (µg/cápsula de Petri)	intervalo de 95% de confianza	Índice de resistencia
Línea de base- Maggi et al. 2008 (a)	0.57	0.25-0.79	
Abril 2014	No estimado	--	
Abril 2016 (b)	1.14	0.69- 2.53	2 (b/a)*
Diciembre 2016 (c)	2.81	1.59- 5.52	4.9 (c/a)
Abril 2017 (d)	4.58	2.18-7.41	8 (d/a)
			4 (d/b)

Nota: * El índice de resistencia (IR) se calculó para las poblaciones de *V. destructor* resistentes de la siguiente manera: IR = CL₅₀ de ácaros resistentes / CL₅₀ de ácaros susceptibles (Al lado de cada población se indica la letra asignada)

2.4 Discusión

Los bioensayos llevados a cabo permitieron evaluar la actividad acaricida en *V. destructor*. La metodología utilizada ha demostrado ser rápida y fácil de implementar al evaluar la respuesta de poblaciones susceptibles y posibles resistentes de *V. destructor* frente a la exposición a acaricidas. Esta metodología fue aplicada exitosamente en estudios previos realizados en poblaciones de Argentina, para la estimación de líneas de base (Maggi et al., 2008) y estudios de detección de poblaciones resistentes en poblaciones de Argentina y Uruguay (Maggi et al., 2009; Maggi et al., 2010; 2011). Cuando se estiman niveles de susceptibilidad es importante usar el mismo método para obtener una adecuada comparación en el tiempo.

En la presente investigación, se observó resistencia a la flumetrina en poblaciones de *V. destructor* de Colonia extendiéndose el conocimiento de la resistencia a acaricidas de *V. destructor* en dicha región. En 2011, Maggi et al. realizaron los primeros ensayos para establecer los valores de CL₅₀ de las líneas de base de acaricidas de síntesis en

poblaciones de *V. destructor* que nunca habían sido expuestas a los mismos. En dicho estudio el valor de CL₅₀ de la flumetrina no se pudo determinar dada la alta mortalidad registrada en la menor concentración ensayada, por eso se definió como un valor CL₅₀ < 0.3 µg/cápsula de Petri (Maggi et al., 2011). El valor de CL₅₀ de línea de base para el acaricida evaluado en la región de estudio es esencial para poder comparar con valores de otras poblaciones con sospecha de resistencia, teniendo en cuenta que diferentes poblaciones de ácaros pueden producir diferentes niveles de susceptibilidad a los acaricidas, dependiendo de la ubicación geográfica en la que se encuentren (Watkins, 1997).

El valor de CL₅₀ de línea de base de la flumetrina estimado para los ácaros del apiario de Colonia fue 34,5 veces más alto que el valor de CL₅₀ de Treinta y Tres, y 10,6 veces más alto. Este resultado, sumado a las fallas detectadas en las curas con flumetrina en el campo, confirmarían el fenómeno de resistencia en esta población.

Existen muy pocos reportes en los cuáles se haya visto resistencia a la flumetrina. La mayoría de los estudios fueron realizados para el *tau*-fluvalinato, perteneciente a la familia de los piretroides. La Tabla 9 presenta los estudios en los que se reportó resistencia a flumetrina en distintas poblaciones de diferentes países y muestra que los índices de resistencia de Uruguay (presente estudio) son similares a los de poblaciones europeas. Las poblaciones de ácaros de México fueron las que mostraron los mayores índices de resistencia. El grado de resistencia a la flumetrina de esas poblaciones fueron evaluadas y comparadas con el valor de la línea de base obtenida para la zona 12 años antes (Perez Santiago et al., 2000; Rodríguez-Dehaibes et al., 2005). Al comparar ambos valores se obtuvo un índice de resistencia muy alto, lo que sugirió un desarrollo de resistencia. Dentro de las posibles razones los autores lo atribuyen a la utilización de productos caseros por parte de los apicultores y a la resistencia cruzada con *tau*-fluvalinato.

El origen de la resistencia en Colonia es desconocido. Podría ser un nuevo foco, o bien causado por la importación de abejas de algún país vecino parasitadas por ácaros resistentes a la flumetrina. Conforme a Martin (2004), la aparición de poblaciones de ácaros resistentes en un territorio generalmente se correlaciona con el movimiento de abejas de un lugar a otro. Estudios futuros deberán considerar el origen de las poblaciones de ácaros en el área, para ver si ya eran resistentes, teniendo en cuenta que las abejas melíferas uruguayas (y sus parásitos) han sido introducidas desde Europa (Antunez et al., 2017). Por otra parte, los ácaros de México tuvieron su origen en abejas africanizadas (Guzmán-Novoa et al., 1999), lo cual podría explicar en parte las diferencias observadas entre los índices de resistencia reportados en la Tabla 9. Estudios futuros deberían involucrar análisis moleculares para poder monitorear el origen de los episodios de resistencia y cómo se puede detener su propagación.

El descubrimiento de resistencia a la flumetrina en un apiario donde dicho acaricida se rotaba con otros para los tratamientos sanitarios, pone en evidencia el potencial de *V. destructor* para adaptarse a la presión de selección impuesta por las prácticas apícolas. Una situación similar fue reportada por Maggi et al. (2011), en una población resistente a cumafós en Uruguay. Se debe tener en cuenta que las prácticas apícolas uruguayas están caracterizadas por aplicar el mismo tratamiento acaricida para el control de *V. destructor* en todas las regiones del país (coordinado por el ente regulador oficial DILAVE) en lugar de realizar una rotación de acaricidas, para evitar fenómenos de resistencia. En la región en la cual se realizaron los estudios, los tratamientos acaricidas se realizaron en otoño. Sin embargo, en las colmenas donde se encontraron ácaros después del muestreo de primavera, se repitió con el mismo acaricida utilizado en otoño.

Tabla 9. CL₅₀ e intervalos de confianza 95% (CI) estimados para la flumetrina con distinto grado de susceptibilidad de poblaciones de ácaros de distintas regiones del mundo

	CL ₅₀ (CI)	Metodología usada	Índice de resistencia (b/a)	Referencias
Población susceptible (México)	0,00087508 µg/ml (a)* (0,000201-0,006554)	Campana de Burgerjon (Burgerjon, 1956)	327	Perez Santiago et al., 2000
Población resistente (México)	0,286 µg/ml (b)** (0,255- 0,321)	Campana de Burgerjon tower (Burgerjon, 1956)		Rodríguez-Dehaibes et al., 2005
Población susceptible (York, Inglaterra)	0,47 mg/kg (a) (0,25-0,73)	cera parafina (Milani 1995)	13,4	Thompson et al., 2002
Población resistente (Devon, Inglaterra)	6,3 mg/kg (b) (3,9-10)	cera parafina (Milani 1995)		Thompson et al., 2002
Población susceptible (Udine, Italia)	0,36 mg/kg (a) (0,26-0,46)	cera parafina (Milani 1995)	entre 30 y 70	Milani, 1995
Población susceptible (Lunz- am-See, Italia)	0,28 mg/kg (a) (0,18-0,39)	cera parafina (Milani 1995)		Milani, 1995
Población resistente (Chiavenna, Italia)	20,4 mg/kg (b) (11,4-33,1)	cera parafina (Milani 1995)		Milani, 1995
Población resistente (Varallo Pombia, Italia)	11,4 mg/kg (b) (5,9- 20,1)	paraffin wax (Milani 1995)		Milani, 1995
Población resistente (Nueva Zelanda)	12 mg/kg (b) (7,6- 17)	cera parafina (Milani 1995)	entre 30 y 40 **	Goodwin et al., 2005
Departamento de Treinta y Tres (Uruguay)	0,11 µg/ml (a) (0,0001-0,25)	método de contacto (Maggi et al. 2008)	entre 10,5 y 34,5	presente estudio
Departamento de San José (Uruguay)	0,36 µg/ml (a) (21-0,49)	método de contacto (Maggi et al. 2008)		
Departamento de Colonia (Uruguay)	3,8 µg/ml (b) (3,1- 4,5)	método de contacto (Maggi et al. 2008)		

Notas:

*Por la metodología utilizada corresponde al valor de DL₅₀

**La comparación se realizó con los ácaros de un apiario susceptible de Italia (Milani, 1995).

Debido a la similitud que existe entre la flumetrina y el *tau*-fluvalinato (ambos piretroides), se han reportado casos de resistencia cruzada (Milani, 1995; Floris et al., 2001; Thompson et al., 2002). En el presente estudio, si bien los ácaros del apiario del

departamento de Colonia fueron resistentes a la flumetrina, no se observó resistencia cruzada con el *tau*-fluvalinato. Profundizar en el estudio de los mecanismos de resistencia que están actuando para la flumetrina podría ser esclarecedor en este aspecto (Martin, 2004).

El estudio de seguimiento al cumafós realizado en Argentina constituye el primer trabajo en el cual se estudia la dinámica de resistencia/susceptibilidad al organofosforado en poblaciones de *V. destructor* a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos demostraron que los ácaros del apiario estudiado tuvieron un decrecimiento de su susceptibilidad al cumafós, a pesar de que el mismo no había sido expuesto a dicho acaricida desde el año 2009. El incremento en los valores de CL₅₀ a lo largo de los años de estudio demuestra que algún proceso aún no determinado estaría actuando y afectando la susceptibilidad de los ácaros al cumafós. Un patrón similar fue observado por Maggi et al. (2011), quienes detectaron resistencia a cumafós en apiarios de Uruguay, a pesar de que en los mismos se habían adoptado estrategias adecuadas para el control de *V. destructor*.

Medici et al. (2016), en un estudio en el que evaluaron la abundancia de residuos acaricidas en la cera, observaron que el cumafós fue el acaricida con mayor presencia: el 87% de las ceras comerciales utilizadas por los apicultores en Argentina presentaron contaminación con dicho acaricida y, en el caso de las ceras de recupero, el 80%. Frente a este escenario, se podría considerar que las poblaciones de *Varroa* podrían estar continuamente expuestas a dosis subletales de cumafós presentes en la cera, con el consiguiente cambio en la susceptibilidad al mismo. Los autores también demostraron una relación positiva entre los residuos de cumafós y la resistencia de *V. destructor* a dicho compuesto. Los resultados informados en nuestro estudio podrían entenderse a la luz de este escenario.

Estudios realizados en poblaciones de *Varroa* demostraron un decrecimiento en la resistencia a piretroides a lo largo del tiempo, donde los niveles de resistencia a *tau*-

fluvalinato disminuyeron significativamente en un periodo de tres años sin exposición al mismo (Milani y Della Vedova, 2002). Resultados similares se observaron en poblaciones de *Varroa* en Florida (Estados Unidos) (Elzen y Westervelt, 2004). Al respecto, Milani y Della Vedova (2002) hipotetizaron que la reversión de la resistencia podría explicarse por el costo reproductivo asociado a la resistencia a piretroides. Sin embargo, Martin et al. (2002) demostraron que dicho costo no existe, o que sería muy bajo, proponiendo que la reversión previamente observada podría haber sido causada por el ingreso de ácaros susceptibles en las poblaciones resistentes. En nuestro estudio, la posibilidad de migración de ácaros se desestimó, dado que el apiario de estudio se encuentra al menos 5 km de distancia de cualquier otro.

La estabilidad de la resistencia a acaricidas ha sido estudiada para varios compuestos en otras especies de ácaros y se han observado una gran variedad de respuestas, casos en los que se observó reversión y situaciones en las cuales la resistencia perduró a lo largo del tiempo (Overmeer et al., 1975; Inoue, 1980; Omoto et al., 1995; Sato et al., 2004; 2005). Estas diferencias pueden ser explicadas por los mecanismos que actúan en el desarrollo de la resistencia. Es posible que diferentes poblaciones de ácaros tengan distintos mecanismos de resistencia que tienen diferentes costos energéticos. Por lo tanto, es importante estudiar tanto los mecanismos de resistencia, así como el costo biológico como aproximación para entender la dinámica en la susceptibilidad al acaricida (Martin et al., 2002).

Los resultados del presente estudio, junto a los reportados por nuestro grupo (Medici et al., 2016), demuestran que la reversión de la resistencia al cumafós en *V. destructor* es un fenómeno que debe ser estudiado en profundidad. El monitoreo de la susceptibilidad usando bioensayos y estudios que permitan la detección de residuos de acaricidas en apiarios donde se detectó resistencia son de suma importancia para poder establecer apropiadas interpretaciones epidemiológicas al respecto.

Los resultados del presente estudio en cuanto al amitraz en los ácaros del apiario de Mar del Plata indican la susceptibilidad a dicho acaricida. No se logró determinar la CL₅₀,

aunque se puede afirmar que la misma fue inferior a 0,25 µg/cápsula de Petri (la concentración más baja utilizada en la que se vio un porcentaje de mortalidad de ácaros del 100 %). Maggi et al. (2008) determinaron una línea de base para poblaciones de ácaros de Mar del Plata de 0,1 µg/cápsula de Petri, es decir que en un periodo de 8 años continúa manteniéndose la susceptibilidad al amitraz en la zona, posiblemente por el manejo de rotación de acaricidas. Los ácaros de Mar del Plata, a su vez, también fueron susceptibles a la flumetrina y al *tau*-fluvalinato. En el caso de la flumetrina no se logró calcular la CL₅₀, pero la misma estaría por debajo de 0,25 µg/cápsula de Petri (la concentración más baja utilizada en la que se vio un porcentaje de mortalidad de ácaros del 84 %), lo cual indicaría, al igual que el amitraz, el mantenimiento de la susceptibilidad. Para el *tau*-fluvalinato se observó algo similar, al exponer a los ácaros al valor de CL₅₀ de base (0,29 µg/cápsula de Petri) (Maggi et al., 2008) se observó un porcentaje de mortalidad de 84 %, por lo que se concluyó que los ácaros del apiario de Mar del Plata se mantuvieron susceptibles al *tau*-fluvalinato.

Los fenómenos de resistencia constituyen una preocupante problemática tanto para apicultores como para autoridades gubernamentales, teniendo en cuenta la evidencia continua de resistencia a acaricidas de síntesis a lo largo del tiempo. El seguimiento del estado de susceptibilidad de las poblaciones de *V. destructor* a lo largo del tiempo aporta información útil para llevar a cabo los manejos sanitarios más adecuados.

Capítulo III



Mecanismos moleculares de la resistencia a acaricidas de síntesis en *Varroa destructor*



3 Capítulo III

3.1 Introducción

El desarrollo de la resistencia de *V. destructor* a acaricidas de síntesis se ha registrado en un gran número de países, sin embargo, existen muy pocos antecedentes relacionados al estudio de los mecanismos que le dan origen (Van Leeuwen et al., 2010). Conocer las bases de la resistencia es crucial para la detección temprana de la resistencia, algo fundamental para reducir la pérdida de colonias y evitar, además, la dispersión de la misma hacia otras poblaciones de ácaros.

Los insectos y los ácaros poseen diversos mecanismos por los cuales pueden sobrevivir a la acción letal de un compuesto químico: a) resistencia metabólica, basada en el aumento de la capacidad metabólica de enzimas detoxificantes (citocromo P450 monooxigenasas (P450s), glutatión-S-transferasas (GSTs) y esterasas (Enayati et al., 2005; Oakeshott et al., 2005b; Li et al., 2007)) que reducen la posibilidad de que sustancias foráneas interactúen con moléculas blanco; b) insensibilidad del sitio blanco, en la cual se produce una modificación del sitio específico sobre el que actúa el plaguicida, impidiendo que éste se una de forma eficaz al sitio blanco para alcanzar su objetivo (Devine, 2003); c) resistencia por penetración reducida, mediante mecanismos que reducen o previenen la absorción o penetración de un tóxico al organismo a través de la cutícula o las paredes del tracto digestivo (Onstad, 2008); y d) resistencia por secuestación, la cual se presenta cuando enzimas o proteínas del cuerpo de un organismo plaga fijan las moléculas de plaguicida y luego las transfieren desde el sitio blanco hacia distintos sitios de reserva (ej.: cuerpos grasos), para su almacenamiento (Onstad, 2008).

Los piretroides actúan sobre el sistema nervioso de los artrópodos, donde modifican la cinética de activación del canal de sodio activado por voltaje (VGSC), una proteína transmembrana que genera la fase ascendente del potencial de acción en las neuronas y otras células excitables (Catterall, 2000). La disrupción de la apertura de los VGSCs

resulta en descargas erráticas y en la pérdida de la señalización neuronal coordinada, llevando eventualmente a la parálisis o la muerte (Soderlund y Bloomquist, 1989). Aunque muchos piretroides han mostrado una alta eficacia contra insectos y ácaros, ciertos compuestos con grupos laterales de ácidos más grandes mostraron una marcada selectividad por ácaros, lo que los hace especialmente interesantes en el control de *Varroa* en los apiarios (O'Reilly et al., 2013).

Se ha registrado resistencia a piretroides en un amplio rango de plagas de cultivos, la mayoría relacionada con la presencia de mutaciones en el gen del VGSC, que causa la sustitución de aminoácidos de la cadena de la proteína (Davies et al., 2007; Rinkevich et al., 2013). Estas sustituciones tienden a agruparse en ciertos sitios denominados “puntos calientes”, y muchos se localizan en los dominios II y III del segmento transmembrana, lugar que recientemente se ha identificado como el posible sitio de unión a los piretroides (Figura 10) (O'Reilly et al., 2006).

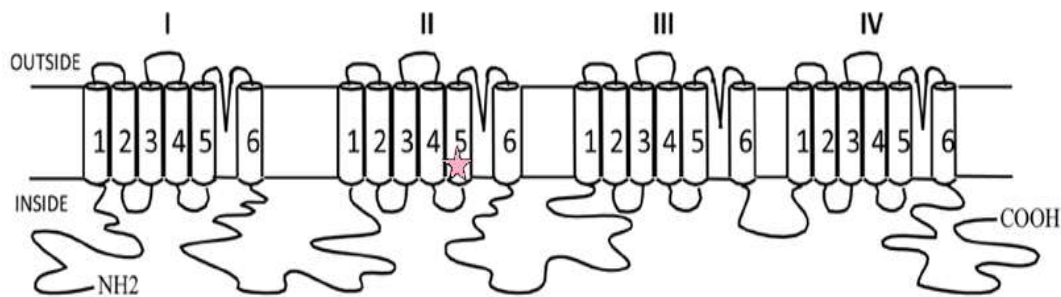


Figura 10. Diagrama de la proteína del canal de sodio que muestra los cuatro dominios principales (I-IV) y el plegamiento propuesto de los segmentos de membrana (S1-S6) dentro de cada dominio. La estrella indica el sitio donde se encuentra la mutación descrita para *V. destructor* resistentes a *tau*-fluvalinato, L925V. Modificado de González-Cabrera et al. (2013).

La mutación involucrada en la resistencia a piretroides más común identificada en insectos es el cambio de leucina de la posición 1014 por fenilalanina (L1014F), localizada en el segmento IIS6 del dominio II. Esta mutación está generalmente asociada con resistencia moderada a los mismos (10-30 veces) y se ha denominado como mutación *kdr* (*knockdown resistance*) (Williamson et al., 1996). Otras mutaciones han sido identificadas y asociadas con la resistencia fuerte (*super-kdr*), las cuales incluyen las sustituciones de metionina 918 (IIS4-S5 enlace), leucina 925, treonina 929, leucina 932 (IIS5 hélice), y fenilalanina 1534, 1538 (IIIS6 hélice) (Davies et al., 2007; Rinkevich et al., 2013). A partir de poblaciones de *V. destructor* del Reino Unido, González-Cabrera et al. (2013) describieron una mutación que produce un cambio en un aminoácido (L925V) del gen del VGSC, localizado en el dominio IIS, en ácaros que sobrevivieron luego del tratamiento con *tau*-fluvalinato. Posteriormente, los mismos autores hallaron la misma mutación en poblaciones del sudeste de Estados Unidos, además de hallar otras en el mismo sitio (sustituciones de leucina 925 por metionina (L925M) y leucina 925 por isoleucina (L925I)) (Figura 10) (González-Cabrera et al., 2016). Las mutaciones L925V y L925I fueron detectadas también en poblaciones de *V. destructor* de Grecia (Alissandrakis et al., 2017).

El cumafós es un acaricida de la familia de los organofosforados (OPs). Estos compuestos actúan a nivel de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), la cual hidroliza el neurotransmisor acetilcolina, responsable de la propagación de la señal en las terminales nerviosas. Por lo tanto, el resultado de la aplicación de un organofosforado es la sobreestimulación del sistema nervioso (Perry et al., 1999). En el ácaro *Tetranychus urticae* se ha observado que la insensibilidad del sitio blanco es el mecanismo de resistencia a OPs más común (Smissaert, 1964). Hasta la fecha, se han descrito varias mutaciones puntuales, como las causantes de la resistencia a los OP, en especies de ácaros e insectos (Oakeshott et al., 2005a). Por ejemplo, se ha descrito la sustitución de fenilalanina 331 por triptófano (F331W) en AChE1 en insectos, arañas y ácaros resistentes a OPs (Oh et al., 2006; Alout et al., 2007; Khajehali et al., 2010;

Kwon et al., 2010). Por otra parte, la posible vinculación de las vías de detoxificación metabólica como componente principal para la resistencia a OPs ha sido descrita en ácaros. Se observó una mayor abundancia de las citocromo P450 en larvas de *Rhipicephalus microplus* resistentes a OP, tratadas y no tratadas, en comparación con las larvas susceptibles tratadas y no tratadas (Guerrero et al., 2007). El proceso mediante el cual *V. destructor* presenta resistencia a cumafós es incierto. Sammataro et al. (2005) observaron un mecanismo mediado por esterasas en una población resistente a *tau*-fluvalinato y cumafós. Sin embargo, estos autores discuten acerca de la presencia de una combinación con otros mecanismos que estarían involucrados en el proceso de desarrollo de resistencia en la población estudiada y en el que se incluyen, además, monoxigenasas P450.

Con el avance de la tecnología, las herramientas disponibles para el estudio de las mutaciones han evolucionado. Es posible detectar Polimorfismos de Nucleótidos Simples (SNPs) asociados a mutaciones puntuales a través de metodologías como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Tiempo Real, *High Resolution Melting* (HRM), *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), PCR alelo específica y secuenciación, entre otras (Bustin, 2002; 2005; Vossen et al., 2009). Por otro lado, los estudios de expresión génica pueden ser utilizados para complementar los estudios de mutaciones y, en este caso, de las asociadas a la resistencia a acaricidas. La expresión génica es generalmente proporcional al número de copias de ARNm de un gen determinado (Stahlberg et al., 2004). Los cambios en los patrones de expresión génica pueden proporcionar indicios sobre los mecanismos moleculares de resistencia. La técnica de PCR en tiempo real logra medir con gran precisión la expresión de genes que están presentes tanto en alto como en bajo número de copias. Esta técnica está basada en la reacción de PCR y se usa para amplificar y, al mismo tiempo, cuantificar moléculas de ADN o ADN complementario (ADNc) (Bustin et al., 2009). Campbell et al. (2016) han realizado importantes contribuciones a los estudios de expresión génica en *Varroa*. Validaron un protocolo de muestreo para obtener ARN de alta calidad y realizaron una

validación de genes de referencia adecuados para su utilización en estudios de expresión.

3.1.1 *Objetivos particulares*

5. Validar metodologías para detectar mutaciones en el genoma de *V. destructor* y evaluar expresión génica asociada a resistencia a acaricidas.
6. Detectar mutaciones asociadas a los mecanismos de resistencia a piretroides en distintas poblaciones de *V. destructor* con diferente grado de susceptibilidad a dicha familia de acaricidas.
7. Evaluar la expresión de genes asociados a resistencia a cumafós en poblaciones de *V. destructor* de una zona de resistencia generalizada a cumafós, antes y después de la aplicación de otros acaricidas.

3.1.2 *Hipótesis:*

H4: Algunas poblaciones de ácaros de Argentina y Uruguay poseen mutaciones en el ADN que le confieren la resistencia a los acaricidas de síntesis.

A partir de H4 se predice la presencia de mutaciones en el gen del canal de sodio que confieren resistencia a acaricidas piretroides.

H5: La expresión de ciertos genes se correlaciona positivamente con los niveles de resistencia a acaricidas de síntesis.

A partir de H5 se predice una variación de los niveles de expresión de los genes AChE y GST de acuerdo a la variación del grado de susceptibilidad al cumafós.

3.2 **Materiales y Métodos**

3.2.1 *Estudio del mecanismo de resistencia a los piretroides: flumetrina y tau-fluvalinato*

3.2.1.1 Toma de muestras de las poblaciones de ácaros

Se obtuvieron hembras adultas de *V. destructor* a partir de colmenas de cuatro apiarios, variables tanto en localización geográfica como en su grado de susceptibilidad/resistencia a la flumetrina y al *tau*-fluvalinato (determinado previamente a través de bioensayos para los apiarios de Treinta y Tres, Colonia y Mar del Plata (Capítulo II, pág. 38) (Tabla 10). El apiario de La Plata es un apiario comercial, en el que se observaron fallas luego del tratamiento con flumetrina, razón por la cual se lo incluyó en el estudio.

Los ácaros se extrajeron de cuadros con cría operculada siguiendo la metodología explicada en el Capítulo I (pág. 33), y fueron conservados en tubos eppendorf con etanol 96 % a 4 °C hasta su utilización.

Tabla 10. Localización, grado de susceptibilidad/resistencia y cantidad de ácaros muestreados de las poblaciones de estudio.

Localización	N° de ácaros colectados	Susceptibilidad a la flumetrina	Susceptibilidad al <i>tau</i> -fluvalinato
Treinta y Tres (Uruguay)	10	Susceptible*	Susceptible**
Colonia (Uruguay)	16	Resistente*	Susceptible*
La Plata (Argentina)	10	Potencialmente resistente- Se detectaron fallas luego del tratamiento con flumetrina	-
Santa Paula, Mar del Plata (Argentina)	13	Susceptible*	Susceptible*

*La susceptibilidad se determinó a través de bioensayos usando el método por contacto (Maggi et al., 2008). Ver capítulo I, sección resultados pág. 38.

** Se asume que la población es susceptible dado que nunca estuvo expuesta a acaricidas de síntesis.

3.2.1.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de ácaros individuales usando el Kit comercial *ADN HP PCR Template Preparation* (Roche Diagnostics). Se realizó una

puesta a punto del método, ensayando diferentes tiempos y temperaturas de incubación con proteinasa K, así como diferentes volúmenes de elución (50 µl, 40µl, 30µl, 20 µl). El ADN extraído se cuantificó usando el ensayo de *Quantit PicoGreen dsDNA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El protocolo final utilizado se detalla en el **Apéndice 1**.

3.2.1.3 Diseño de oligonucleótidos o cebadores

Se probaron los oligonucleótidos Vd_L925V (González-Cabrera et al., 2013), y a su vez se diseñaron otros usando el Software Primer Premier (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA), en base a una secuencia del gen VCSG de *V. destructor* que se encuentra en el *GenBank* (código de acceso KC152656.2) (Figura 11). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL, USA). La Tabla 11 resume todos los oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.

Tabla 11. Oligonucleótidos usados en este estudio. Todos fueron sintetizados por Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL, USA).

Genes	5' - 3' secuencia	Temperatura de annealing (°C)	Longitud del producto (pares de bases)
Vd_L925V	Forward: CCAAGTCATGGCCAACGTT	60	97
	Reverse: AAGATGATAATTCCCAACACAAAGG		
SNP489	Forward: CGTCGCTGTATCTCCCAGAC	62	489
	Reverse: GCAAGTTTTGACCTTCGCCTTCGTC		
140	Forward: GGGCAAGACGATAGGAGC	62	140
	Reverse: AAAGCGTGAAGTGCGATA		
L925V MUT	Forward: GATAGGAGCTGTGGGTA	62	235; 110
	Reverse: SNP489; 140*		
L925VWT	Forward: GATAGGAGCTGTGGGTA	62	235; 110
	Reverse: SNP489; 140*		

Nota: *como oligonucleótidos reverse se utilizaron los oligonucleótidos reverse de la combinación SNP489 y 140.


```

1381 ctgcagataa accgggattt gccaaattaa acagatctgt aggcagtgtc tacattatta
1441 ttaggtcttt gccattgcta cgtcgtgta tctcccagac tctttctccc tccctccctc
1501 cctctctctc tttctccctg tatacgtata tatatatata tttctctctg acacattgcc
1561 gcgcgcatta aacgcattaa ctaaagcaat aagtaaaaat tatgaatcgt ttctgcgtgt
1621 gtacgttaca gttgagagtc ttcaaactag ccaagtcatt gccaacgttg aatctactga
1681 tatctatcat gggcaagacg ataggagctg tgggtaacct gacctttgtg ttgggaatta
1741 tcatcttcat tttcgccgtt atgggcatgc aacttttcgg caagaactat ctcgacaaca
1801 agtggtttgtg agtatcgac ttcacgcttt ttccttcgtt ggctcattgt agcgcttctc
1861 actctctgtc agcttccttg tgacctcgct tctctcttcg tgatactagt acgatgtatg
1921 cggccccact cgacgaaggc gaagggtcaaa acttgc tcca cggtacaac agcggttagc
1981 ttccgctgct gctggtcgcg ggtgtgggat gtggccagcc tgcatatagc gtatggaagg

```

Figura 11. Fragmento de la secuencia del gen del canal de sodio (VCSG) de *Varroa destructor* (Código de acceso del *Genbank*: KC152656.2). En colores se marcan las bases donde se alinean los oligonucleótidos utilizados en el presente estudio. Referencias: SNP489; 140; Vd_L925V; L925V MUT; L925VWT. En amarillo se muestra el sitio donde se da la mutación que da origen al cambio de Leucina por Valina en la secuencia de aminoácidos.

3.2.1.4 PCR en tiempo Real

La amplificación por PCR en tiempo real fue realizada en un termociclador Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany), usando EvaGreen como intercalante de señal fluorescente. Para cada par de oligonucleótidos se realizó una puesta a punto con el fin de determinar la temperatura de alineamiento (*annealing*) óptima. Se usó un programa de ciclado que consistió en una ronda de desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, y 45 ciclos de 94 °C 20 seg, 20 seg a la temperatura de *annealing* específica para cada par de oligonucleótidos (Tabla 11) y 72°C 30 seg.

3.2.1.5 Secuenciación

Los productos de PCR fueron sembrados y separados en un gel de agarosa (1,5 % a 90 volts durante 40 min), teñidos con una solución 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en buffer TBE 1X y visualizados en un transiluminador U.V. Se cortaron y purificaron las bandas correspondientes usando el Kit de purificación *Accuprep Gel Purification Kit* (Bioneer, South Korea). Los fragmentos purificados fueron secuenciados usando *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) con *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Se analizaron los electroferogramas en busca de las mutaciones.

Análisis de las frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas se calcularon siguiendo las siguientes ecuaciones (Hardy, 1908):

$$p = \frac{1.0 (AA) + 0.5 (Aa)}{N}$$

$$q = \frac{1.0 (AA) + 0.5 (Aa)}{N}$$

Siendo p la frecuencia del alelo salvaje y q la frecuencia del alelo mutado.

3.2.2 Estudio de mecanismo de resistencia al cumafós

3.2.2.1 Toma de muestras de la población de ácaros en estudio

Se procedió a la toma de muestras de hembras adultas de *V. destructor* a partir de colmenas de abejas pertenecientes al apiario experimental ubicado en el Barrio Santa Paula, Mar del Plata, Argentina.

La toma de muestras se realizó luego de los bioensayos con cumafós realizados en diferentes años (Capítulo 2) Los ácaros que sobrevivieron en los tratamientos y el control fueron puestos en tubos eppendorf, con 0,2 ml de TRIzol (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, USA) y almacenados a -20 °C. La cantidad de bioensayos realizada en cada año, varió de acuerdo al número de ácaros disponibles en la población estudiada.

3.2.2.2 Extracción de ARN

Se realizó una puesta a punto de la extracción de ARN total testeándola a partir de diferentes cantidades de ácaros y finalmente se decidió realizar la misma a partir de grupos de 11 ácaros por tratamiento, usando 200 µl de TRIzol. Los ácaros se homogeneizaron con varilla de vidrio y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Luego se añadieron 40 µl de cloroformo a 4 °C, se agitaron los tubos vigorosamente durante 20 seg y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugó a 12.000 g por 15 min a 4 °C y se transfirió cuidadosamente la fase acuosa superior a un tubo libre de ARNasas. Se añadieron 500 µl de isopropanol y 2 µl de glicógeno (5mg/ml), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se procedió a la centrifugación a 12.000 g durante 15 min a 4 °C para precipitar el ARN. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µl de etanol 75 % a 4 °C. Se centrifugó a 7.500 g durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por 5 min. Se resuspendió el ARN en 40 µl de agua libre de ARNasas y se incubó 10 min a 55 °C para favorecer la resuspensión.

El ARN obtenido fue digerido con ADNasa I (Qiagen, Hilden, Alemania) para eliminar ADN genómico contaminante. La digestión se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl. A partir de 1,5 µg de ARN contaminado con ADN genómico se agregaron 2 µl de Buffer de ADNasa, 0,25 µl de Inhibidor de Ribonucleasas Riboblock (Fermentas, Maryland, EEUU), 0,20 µl ADNasa (0,5 kilounidades), y se llevó al volumen final (18 µl) con agua

libre de ARNasas. Se incubó 30 min a 37° C, se agregaron 2 µl de EDTA 25 mM y se incubó 5 min a 65 °C para inactivar la ADNasa.

3.2.2.3 Retrotranscripción

La retrotranscripción se realizó mediante la enzima MMLV (Invitrogen Corp.) a partir de 10 µl del ARN tratado con ADNasa en un volumen final de 20 µl. Se incubó el ARN a 70 °C durante 10 min junto a los “*random hexamers*” (secuencias de oligonucleótidos de 6 bases sintetizadas de forma aleatoria, para dar un rango de secuencias que tienen el potencial de alinearse con muchos puntos de la secuencia de ARN actuando como cebadores para comenzar la síntesis de la cadena de ADNc), y se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min. Luego se agregaron 4 µl de “*First Strand Buffer*” 5X (Invitrogen Corp.), 2 µl de 0,1 M DTT, 1 µl de dNTPs 10mM y 0,5 µl de Inhibidor de ARNasas RNase Out (Invitrogen Corp.), y se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se calentó a 42 °C durante 2 min y se agregó 1 µl de retrotranscriptasa MMLV (Invitrogen Corp.). Se incubó a 42 °C durante 50 min, durante 15 min a 70 °C y finalmente, durante 10 min a 4 °C. El ADNc se conservó a -20 °C hasta su utilización en los ensayos. En todas las reacciones de retrotranscripción se procesó un control sin ARN y un control negativo de retrotranscripción sin la enzima retrotranscriptasa.

3.2.2.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para los genes AChE y GST fueron diseñados utilizando el Software Primer Premier (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA) en base a secuencias de *V. destructor* que se encuentran en el *GenBank* (códigos de acceso FR668088.1 y KJ499538.1, respectivamente). Como gen constitutivo se utilizó al de la B-actina (Moore et al., 2011). La Tabla 12 muestra la lista de oligonucleótidos utilizados. Los pasos seguidos para el diseño de los cebadores se detallan en el Apéndice 2.

Tabla 12. Oligonucleótidos usados en este estudio

Genes	5' - 3' secuencia	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Longitud del producto (pares de bases)
AChE	Forward: GTGTTTGGACGCTTCTTA	52	152
	Reverse: CAATGTGGGATTCTGACC		
GST	Forward: CTATTATGAGATACTTGGGACG	50	143
	Reverse: TCGCTCGAACTTGGACT		
β-Actina	Forward: GTCTCTGTTCCAGCCCTCGTTC	52	62
	Reverse: TGAAGGTAGTCTCATGGATAC		

3.2.2.5 Amplificación por PCR en tiempo real

Para cada par de cebadores se probaron diferentes temperaturas de *annealing* de manera de poder optimizar las condiciones de reacción.

El protocolo de amplificación se seleccionó en función de las características de los oligonucleótidos. Los productos de la PCR fueron analizados empleando electroforesis en geles de agarosa al 2,5% y seguidos de tinción con una solución 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en buffer TBE 1X y fueron visualizados en un transiluminador U.V. Para todos los pares de cebadores, se corroboró que los negativos de retrotranscripción (sin retrotranscriptasa) no presentaran producto de PCR y que en todas las reacciones se haya amplificado el producto del peso molecular esperado. Las reacciones de PCR en Tiempo Real se realizaron utilizando una mezcla preformada y optimizada de todos los componentes de la reacción (MyTaq HS, Bioline), exceptuando cebadores, moldes y agua, en un volumen final de 20 µl y por duplicado. La detección del producto amplificado se monitoreó en un equipo Rotor Gene 6000, que mide el aumento de la fluorescencia en cada ciclo de PCR causado por la unión del EvaGreen al ADN de doble cadena y además tiene la capacidad de realizar análisis de *High Resolution Melting*. A través del cual se efectuó una curva de disociación en cada caso, para corroborar que se estaba amplificando el producto de tamaño esperado y para asegurar que no se hayan formado dímeros de oligonucleótidos que pudieran estar interfiriendo en la lectura

de fluorescencia del termociclador. Todas las determinaciones se efectuaron con una concentración de cebadores de entre 448 a 900 mM. Para una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión génica en estudio, se utilizó el método 2 delta-delta Ct ($2 \Delta\Delta CT$).

3.3 Resultados

3.3.1 *Mecanismos de resistencia a la flumetrina*

Luego de probar diferentes estrategias para la extracción de ADN, se realizó exitosamente la extracción de ADN a partir de un ácaro (protocolo final en **Apéndice 1**). A su vez, se logró la amplificación de la región en la cual se encuentra la mutación en el gen del canal de sodio (VCSG) con los pares de oligonucleótidos diseñados, seleccionándose como la mejor combinación para el estudio de la mutación por secuenciación la de SNP489f y 140r, que permiten generar un producto de amplificación de 370 pb. También se diseñaron oligonucleótidos para aplicar la técnica de PCR alelo específica, los mismos se alinean con la secuencia del gen VSCG en el sitio donde se encuentra la mutación L925V (Figura 11) sin embargo, no se logró obtener producto de amplificación con los mismos, por lo que no se tuvieron en cuenta para el análisis de determinación de la mutación en todos los individuos de las distintas poblaciones de estudio.

La secuenciación del fragmento IIS5 (489 pb) del gen VGSC amplificado permitió determinar cuáles ácaros son portadores del alelo susceptible y cuáles del alelo mutado. A su vez, esta metodología también permitió discriminar entre homocigotas para el alelo salvaje (L925) y heterocigotas y homocigotas para el alelo mutado (V925) (Figura 12).

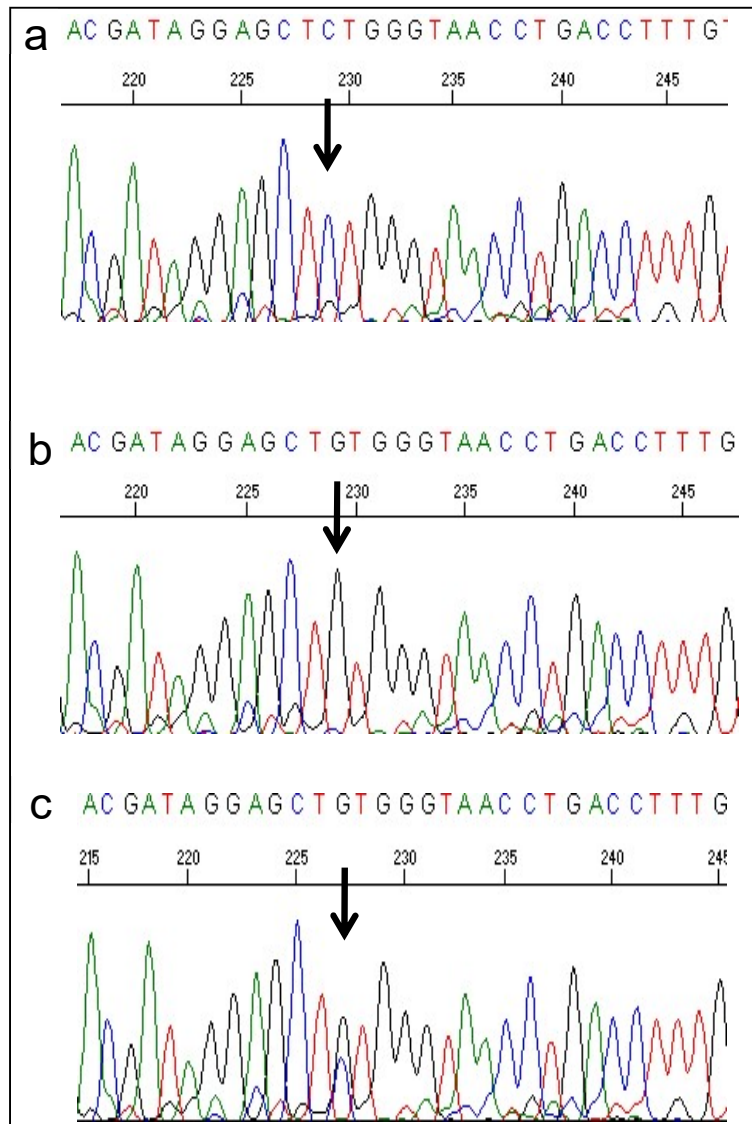


Figura 12. Electroferogramas obtenidos por secuenciación de la secuencia parcial del gen de canal de sodio (VCSG) de *V. destructor* de diferentes poblaciones. A: ácaros homocigotas para L925 de tipo salvaje (se observa la presencia de citosina y la ausencia de guanina). B: ácaros homocigotas para la mutación V925 (se nota la presencia de guanina y la ausencia de citosina). C: Ácaro heterocigota, se observa la presencia de guanina y citosina.

En la Tabla 13 se pueden observar los genotipos presentados en las poblaciones de estudio. En el caso de las poblaciones de Colonia y La Plata, los ácaros presentaron los alelos de resistencia en homocigosis para el caso de todos los individuos de la población de La Plata, mientras que la población de Colonia presentó individuos

homocigotas para la mutación, o heterocigotas. Los ácaros de la población de Treinta y Tres presentaron el alelo susceptible en homocigosis, mientras que los individuos de la población de Mar del Plata presentaron tanto el alelo resistente como el susceptible (Tabla 13).

Tabla 13. Genotipos y frecuencias alélicas de ácaros provenientes de varias poblaciones diferentes. Los datos fueron obtenidos por secuenciación de la secuencia parcial del gen del canal de sodio (VCSG) de *V. destructor*.

Localización de la población	SS*	SR*	RR*	N° de ácaros analizados	Frecuencia alélica	
					salvaje	mutado
Treinta y Tres (Uruguay)	10	0	0	10	1,0	0
Colonia (Uruguay)	0	4	12	16	0,17	0,83
La Plata (Argentina)	0	0	10	10	0	1,0
Mar del Plata (Argentina)	5	5	3	13	0,50	0,50

*Número de ácaros de cada genotipo detectados en las muestras.

3.3.2 Estudio de mecanismo de resistencia al cumafós

El porcentaje de mortalidad de ácaros de ambos bioensayos realizados durante el estudio se muestra en la Tabla 14. No hubo diferencias significativas en los niveles de mortalidad de *V. destructor* para las distintas concentraciones, al comparar el ensayo de 2014 con el de 2016 ($p>0.05$). Sin embargo, se observó que en el ensayo de 2014 el porcentaje de mortalidad de ácaros fue más bajo, incluso a la mayor concentración utilizada con respecto a los ensayos de 2016.

Tabla 14. Mortalidad de ácaros (%) luego de 24 h de exposición a diferentes concentraciones de cumafós en los diferentes años.

	Concentración de cumafós (µg/cápsula de Petri)					
	0,25	0,5	1	2	2,16	Control
Abril 2008*	-	48	84	-	92	4
Abril 2014	48	56	44	48	-	0
Abril 2016	27.7 (16.0)	44.7 (3.0)	56 (5.3)	72 (5.3)	-	15 (0)

*Datos extraídos de Maggi et al. (2008), de una población de ácaros susceptibles, de la provincia de Bs. As.

Se realizó la puesta a punto de la extracción de ARN a partir de un grupo de ácaros para estudios de expresión génica, así como de los oligonucleótidos diseñados en este estudio. Es decir que, se logró desarrollar con éxito una herramienta molecular para estudiar los niveles de ARNm de AChE y GST en *V. destructor*, en el Apéndice 3 se incluyen las optimizaciones de las reacciones por PCR en Tiempo Real de cada gen.

En los ácaros de los bioensayos de 2014 y 2016 se observó un aumento de los niveles de expresión de AChE de los ácaros expuestos al cumafós con respecto al control; para el ensayo de 2016 se observaron los mayores niveles a la concentración de 0.5 µg/ml (Figura 13.a y b).

Los ácaros pertenecientes al ensayo de 2014 presentaron un decrecimiento en los niveles de GST a medida que aumentó la concentración de cumafós a la que estuvieron expuestos (Figura 13.a), mientras que, los ácaros del ensayo de 2016, mostraron un leve incremento en los niveles de transcriptos de GST, a medida que aumentó la concentración de cumafós a la que estuvieron expuestos (Figura 13.b).

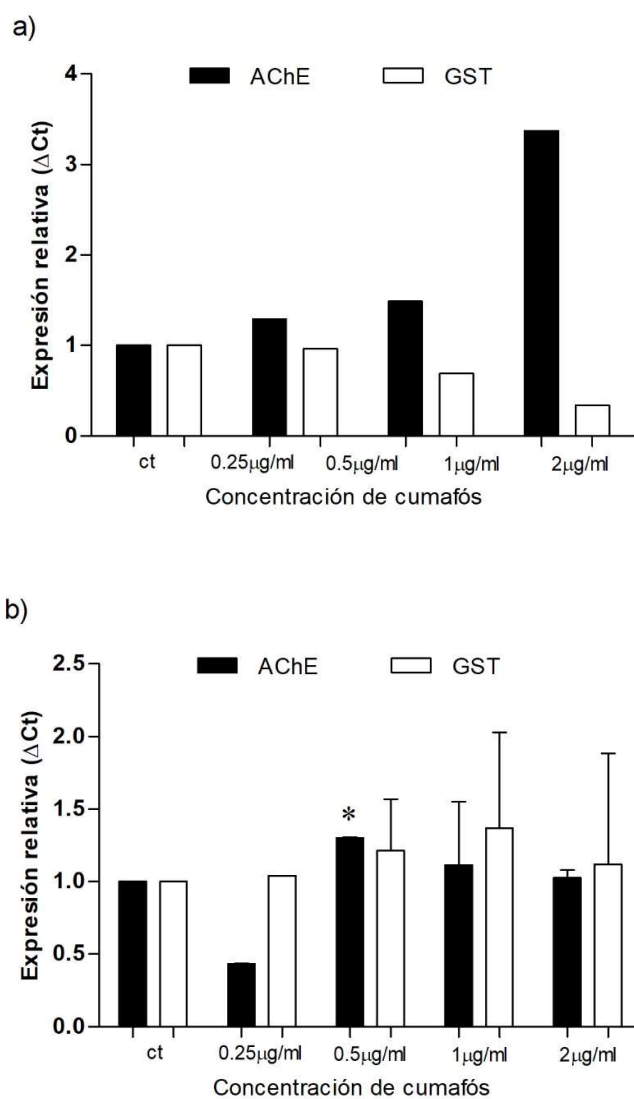


Figura 13. Niveles de expresión relativa de transcritos de AChE y GST de *V. destructor* expuestos a concentraciones crecientes de cumafós; a): ácaros provenientes del bioensayo realizado en 2014; b): ácaros provenientes del bioensayo realizado en 2016 (las barras corresponden a los resultados promedio de duplicados). Los ácaros fueron homogenizados en pools de a 11 individuos y el ARN total fue extraído. Las muestras fueron analizadas usando qRT-PCR y las cantidades relativas de transcritos fueron calculadas usando el método de ddCT.

3.4 Discusión

El estudio y la comprensión de los mecanismos involucrados en la resistencia a acaricidas de síntesis son cruciales para generar herramientas para la detección en forma temprana poblaciones de *V. destructor* resistentes. Para el estudio del mecanismo de resistencia a piretroides, se examinó un fragmento de la secuencia nucleotídica del gen VCSG comprendida en la región del segmento IIS5 (489 pb), donde una serie de mutaciones que confirman la reducción de la sensibilidad a piretroides del canal de sodio han sido descritas en varias especies de artrópodos: M918I/L/T/V, L925I, T929C/I/N/V, L932F, G933 V y I936 V (Rinkevich et al., 2013; Dong et al., 2014). La mutación L925V es reportada aquí por primera vez, en poblaciones de ácaros pertenecientes a Sudamérica. Aunque dicha mutación había sido asociada inicialmente a la resistencia a *tau*-fluvalinato (González-Cabrera et al., 2013; Hubert et al., 2014; Alissandrakis et al., 2017), recientemente se asignó también dicha mutación a la resistencia a flumetrina (González-Cabrera et al., 2018). En el presente estudio se observó que dicha mutación estuvo presente en poblaciones resistentes a la flumetrina y que, a su vez, las mismas no eran resistentes al *tau*-fluvalinato. Los ácaros de las poblaciones resistentes (Colonia y La Plata) mostraron la presencia de la mutación en homocigosis, aunque en el caso de los ácaros de la población de Colonia hubo algunos individuos heterocigotas para la mutación, aunque en menor proporción con respecto a los homocitogas mutados. En cambio, en la población susceptible (Treinta y Tres), que nunca estuvo en contacto con acaricidas de síntesis, solo se observó el alelo salvaje en homocigosis en todos los individuos estudiados. La baja frecuencia de individuos heterocigotas coincide con los resultados de otros estudios realizados para otras poblaciones (González-Cabrera et al., 2013; Alissandrakis et al., 2017). Ésta podría explicarse teniendo en cuenta la alta consanguinidad que ocurre en *V. destructor* y su modo de herencia haplodiploide (Solignac et al., 2005). A su vez, la presión selectiva ejercida por los tratamientos intensos con piretroides es probablemente una fuerza impulsora que conduce a esta

distribución particular de genotipos en sus poblaciones. González-Cabrera et al. (2013; 2016; 2018) sugirieron que la resistencia en *V. destructor* podría heredarse como un rasgo recesivo. En el presente estudio observamos que las poblaciones resistentes presentaron muy pocos individuos recesivos (población de Colonia) o ninguno (población de La Plata); mientras que la población de Mar del Plata, que a través de bioensayos se determinó como susceptible, presentó una proporción de individuos heterocigotas mayor. Esto coincide con observaciones previas en poblaciones de varias especies con mutaciones kdr o super-kdr (Davies et al., 2007). A su vez, se debe destacar la importancia de haber puesto a punto una técnica que permite la detección temprana de la resistencia, lo cual tiene una implicancia directa en el manejo de la misma. Si se analiza el caso de la población de ácaros de Mar del Plata que, con la técnica de bioensayos se diagnosticó como susceptible, luego de realizar estudios para la detección de la mutación L925V, en los cuales se observaron varios individuos portadores de la mutación de la resistencia, se podría decir que la misma es una población en vías potenciales de dar resistencia a la flumetrina si no se aplica el manejo integrado correcto.

La rotación de acaricidas es un componente clave para el manejo de la resistencia (Eguaras y Ruffinengo, 2006). Nuestros resultados indican que a pesar de haberse aplicado en los apiarios de Colonia, Mar del Plata y La Plata (usualmente se rotó amitraz con flumetrina, Capítulo I), en algunos de ellos se desarrollaron poblaciones resistentes a flumetrina. El desarrollo de la resistencia es uno de los mayores problemas para el manejo de especies plaga. En el caso de *V. destructor*, este problema se ve agravado si se considera el bajo número de opciones de acaricidas de síntesis para los tratamientos (Rosenkranz et al., 2010).

Los estudios de expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real pueden ser de gran utilidad para el estudio de mecanismos de resistencia (Campbell et al., 2016). En el presente estudio se evaluó la dinámica de resistencia/susceptibilidad al cumafós a través de los años y su relación con los mecanismos de resistencia. Se observó que el

porcentaje de mortalidad tuvo alguna variación a lo largo de los años y esto se reflejó en los niveles de expresión génica de los genes estudiados. Se evaluó la idoneidad de dos genes candidatos para su utilización en estudios de resistencia a acaricidas en *V. destructor*. En particular se realizó un análisis de la expresión génica en una población de ácaros de *V. destructor* ubicada en una zona de resistencia generalizada a cumafós, antes y luego de la aplicación de otros acaricidas, estudiando la expresión de GST y AChE en relación a dicho acaricida.

GST desempeña un importante rol en la fase II de la detoxificación de compuestos xenobióticos tales como pesticidas (Li et al., 2007). Muchos estudios han propuesto a GST como candidata para el estudio de la resistencia de muchos de los principios activos utilizados en el manejo de plagas de varios insectos, sin embargo, poco es sabido sobre el mecanismo involucrado en la resistencia en especies de ácaros (da Silva Vaz et al., 2004). En los ensayos de 2014 se observó que los ácaros expuestos a concentraciones crecientes de cumafós tuvieron un decrecimiento en los niveles de expresión de GST, aunque en los ensayos de 2016, en los cuales los ácaros mostraron una menor tolerancia al acaricida, los niveles de GST permanecieron estables o mostraron un leve incremento al aumentar la concentración de cumafós aplicado. Por lo tanto, la implicancia de esta enzima en la resistencia de cumafós no se puede descartar con los resultados obtenidos. Se debe tener en cuenta que el nivel de susceptibilidad/resistencia en la población estudiada fue cambiando a lo largo del tiempo, lo que podría también asociarse al manejo llevado a cabo en el apiario. La población estudiada se encuentra en un área de uso intensivo de cumafós durante muchos años. Entre el bioensayo realizado en 2014 y los bioensayos de 2016, se realizaron tratamientos acaricidas en el periodo pos-cosecha (como es habitual para la zona) con amitraz, flumetrina y ácido oxálico, respectivamente en el tiempo, por lo que sería esperable una modificación en la respuesta de los ácaros hacia el cumafós.

Por otra parte, se observó que los ácaros expuestos a concentraciones crecientes de cumafós tuvieron un incremento en los niveles de AChE en ambos ensayos, siendo

ésta el sitio blanco sobre la que actúa el cumafós. Los transcriptos elevados del gen AChE, luego de la exposición a cumafós, podrían ser uno de los mecanismos necesarios para contrarrestar el efecto inhibitorio del acaricida.

Capítulo IV



Estudio de la suplementación dietaria con fitomoléculas en *Apis mellifera* para mitigar los efectos de los acaricidas de síntesis



4 Capítulo IV

4.1 Introducción

Una adecuada nutrición es la base para el crecimiento y desarrollo de la colmena. De Groot (1953) reportó los aminoácidos requeridos para el crecimiento y desarrollo de la abeja melífera y Haydak (1970) revisó extensivamente los requerimientos dietarios generales de las abejas melíferas. Estos conocimientos llevaron a la formulación de dietas especiales como soporte para el desarrollo de las colmenas (Campana y Moeller, 1977; Herbert y Shimanuki, 1977; Herbert et al., 1977; Herbert y Shimanuki, 1978a, Herbert y Shimanuki, 1978b, Herbert 1980; Herbert et al., 1980; Loper y Berdel, 1980a; Loper y Berdel, 1980b; Herbert y Shimanuki, 1982; Herbert et al., 1985; Schmidt y Buchmann, 1985; Herbert et al., 1988; Cremonez et al., 1998; Pernal y Currie, 2000; van der Steen 2007; DeGrandi-Hoffman et al., 2008; Pankiw et al., 2008; Avni et al., 2009; Brodschneider et al., 2009). Debido a que el paisaje natural se ha visto cada vez más afectado por el incremento de la agricultura intensiva dominada por los monocultivos, y a que los servicios de polinización ocurren a menudo en un “ecosistema” definido y manipulado por el hombre, las necesidades nutricionales de las abejas pueden no ser provistas adecuadamente (Naug, 2009). Por lo tanto, la cuestión que se plantea gira en torno a si deben proporcionarse suplementos dietarios a las abejas cuando ocurren dichos déficits nutricionales, y cómo se debe hacerlo (Brodschneider y Crailsheim, 2010).

Las abejas melíferas son insectos sociales, muchas veces consideradas como un super- organismo (Seeley, 1989). Por lo tanto, la nutrición puede ser investigada en tres niveles: nutrición de la colonia, nutrición de los adultos y nutrición en el estadio larval, lo cual a su vez incrementa la complejidad, porque los desórdenes en los estadios previos afectan subsecuentemente en los estadios subsiguientes y viceversa. En este sentido, una escasez de reservas de polen puede dificultar en que las obreras no alimenten bien a las larvas o que todas las larvas no lleguen al estadio adulto. Por lo tanto, la cantidad

de adultos de la siguiente generación puede ser baja, lo cual, a su vez afectará en la nutrición de la colonia, por lo tanto, influenciando en el desarrollo de la misma (Figura 14) (Brodschneider et al., 2010).

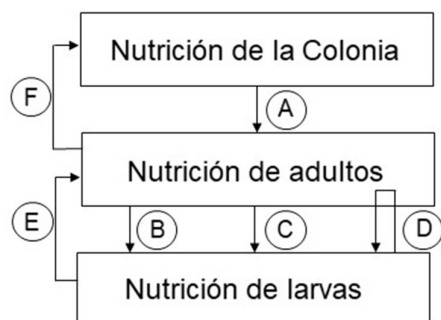


Figura 14. Representación esquemática de los tres niveles de la nutrición en las abejas melíferas, dependencias y posibles efectos de la deficiencia en proteínas. A: dependencia de los adultos de las reservas; B: inversión en nutrición de calidad de las larvas; C: regulación del número de larvas; D: canibalismo; E: impacto de la nutrición larval en la siguiente generación de adultos; F: impacto de los adultos en la nutrición de la colonia¹

En una colonia, los niveles nutricionales están estrechamente conectados a través de numerosas interacciones adulto-cría e interacciones trofalácticas. La trofalaxis es la transferencia social de alimento, desde un individuo adulto a otro, generando un “estómago común”, que permite a las abejas tener un conocimiento del estado nutricional de la colonia (Crailsheim, 1991; 1998). Tanto las larvas como los adultos son altamente dependientes de las reservas alimenticias de la colonia, las abejas adultas pueden adaptar sus estrategias de forrajeo o cuidado de la cría, de acuerdo con la

¹ Modificado de Brodschneider et al., 2010

necesidad y el suministro respectivo de carbohidratos y proteínas (Schmickl y Crailsheim, 2004).

El néctar y el polen, tanto en su forma sin procesar, así como en su forma procesada como miel y pan de abejas, han sido considerados como las principales fuentes naturales de carbohidratos y proteínas, respectivamente, para las abejas melíferas (Brodschneider y Crailsheim, 2010). El néctar es colectado por las obreras pecoreadoras, transportado a la colonia y finalmente almacenado como miel. La transformación del néctar a miel es un proceso gradual que comienza durante el vuelo de regreso (Nicolson y Human, 2008). En la colonia el contenido de agua es reducido a un 16-20% y las enzimas (invertasa, diastasa y glucosa oxidasa) son adicionadas, las cuales contribuyen para la composición final de la miel: un promedio de 38% de fructosa, 31% de glucosa y otros disacáridos y trisacáridos (Doner, 1977).

En contraste con la miel, solo una pequeña cantidad de polen es almacenado en la colonia en un momento dado y las reservas rápidamente disminuyen durante los periodos en los que no hay forrajeo (Schmickl y Crailsheim, 2001; 2002). En la colonia, las abejas mezclan el polen con néctar regurgitado, miel y secreciones glandulares para producir el pan de abejas, el cual difiere del polen fresco colectado en que tiene un pH más bajo y una menor cantidad de almidón (Herbert y Shimanuki, 1978a; Ellis y Hayes, 2009). El valor nutritivo del pan de abeja es mucho más alto que el de cada componente fresco, el almacenado en el laboratorio o el polen congelado con muy pocas excepciones (Hagedorn y Moeller, 1968; Herbert y Shimanuki, 1978a; Dietz y Stevenson, 1980; Cremonez et al., 1998; Pernal y Currie, 2000).

Además de la fuente de carbohidratos y proteínas las abejas melíferas también requieren de la ingesta de otros nutrientes como lípidos, vitaminas, minerales y fitoquímicos (Haydak, 1970; Mao et al., 2009; 2013; 2015). Particularmente los fitoquímicos cumplen funciones importantes para las abejas melíferas y su ausencia puede tener efectos que aún no están del todo claros (Liao et al., 2017).

Además del daño directo de *V. destructor* para las abejas, otros efectos indirectos han sido reportados como consecuencia de los productos utilizados para su control. Generalmente, la mayor cantidad de residuos de pesticidas encontrados en las colmenas son productos químicos que se han introducido en la misma intencionalmente en un intento por mitigar los efectos de *V. destructor* (Johnson et al., 2010; Mullin et al., 2010). Hay muchas investigaciones en las cuales se estudió el impacto de los acaricidas de síntesis en *A. mellifera*. Como ejemplo, se observó que la exposición al *tau*-fluvalinato y/o el cumafós puede reducir el aprendizaje, la memoria y la orientación, así como alterar la locomoción y la alimentación de obreras adultas (Teeters et al., 2012; Frost et al., 2013; Williamson y Wright, 2013). También se observó que estos acaricidas reducen la supervivencia de las larvas (Wu et al., 2011; Zhu et al., 2014), y tienen un efecto en la reproducción, afectando tanto a reinas como zánganos (Rinderer et al., 1999; Haarmann et al., 2002; Burley et al., 2008).

En general, la detoxificación de xenobióticos implica diferentes reacciones enzimáticas que resultan en la conversión de sustancias lipo-solubles a compuestos hidro-solubles, los cuales son metabolitos más fácilmente excretables. Dichas reacciones se dividen en tres fases que presentan características particulares. En la fase I de la detoxificación, la estructura de las toxinas es enzimáticamente modificada a una forma que es incapaz de interactuar con sitios lipófilos (Berenbaum y Johnson, 2015). Tales cambios son efectuados primariamente por las enzimas P450 monoxigenasas (P450) y carboxilesterasas (CCE), aunque otras enzimas pueden también contribuir a dichos procesos (Xu et al., 2013). Las reacciones de la fase II típicamente implican la conjugación de los productos que previamente fueron modificados en la fase I, para la solubilización y el transporte. Las glutathion S-transferasas son las principales enzimas de esta fase, aunque ellas también pueden actuar como enzimas de la fase I (Xu et al., 2013; Berenbaum y Johnson, 2015).

Finalmente, en la fase III los conjugados de la fase II se transportan fuera de la célula para ser excretados (Dermauw y Van Leeuwen, 2014).

Se ha reportado que en *A. mellifera* los acaricidas de síntesis son metabolizados por las P450 (Johnson et al., 2006; Mao et al., 2011). Sin embargo, curiosamente, el genoma de *A. mellifera* contiene solo 46 genes que codifican enzimas P450, un número mucho menor que en la mayoría de los insectos (Tabla 15).

Tabla 15. Inventario del genoma de detoxificación para *Apis mellifera* y otras especies (Claudianos et al., 2006; Ahn et al., 2012; Xu et al., 2013).

	<i>Apis mellifera</i>	<i>Bombus huntii</i>	<i>Megachile rotundata</i>	<i>Nasonia vitripennis</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
P450	46	44	52	92	85
CCE	24	23	22	41	35
GST	10	11	9	16	38
UDP-GT	12	2	2	22	34
Total	92	80	85	171	192
Historia de vida	Polinizador social	Polinizador social	Polinizador solitario	Parasitoide solitario	Saprotrofo solitario
Orden	Hymenoptera	Hymenoptera	Hymenoptera	Hymenoptera	Diptera

Algo similar se observa en las familias de enzimas CCEs y GSTs. En este sentido, también en el genoma de *A. mellifera* hay una reducción en el número de genes que codifican para estas enzimas (Tabla 15) (Claudianos et al., 2006). Algunos autores proponen que estas diferencias podrían ser compensadas por una serie de adaptaciones comportamentales resultantes de la naturaleza social de *A. mellifera* (Tihelka, 2017). En relación a esto, en los últimos años se ha propuesto una cuarta fase de detoxificación llamada “fase 0”, caracterizada por un comportamiento específico de las abejas mediante el cual pueden forrajear selectivamente ciertas plantas e incorporar componentes minoritarios presentes en el polen y el néctar (Figura 15) (Berenbaum y Johnson, 2015). Estos componentes minoritarios pueden contribuir en la dilución de toxinas o actuar como estimuladores de los mecanismos involucrados en la fase I y II de la detoxificación (Mao et al., 2009; 2013; Schmehl et al., 2014).

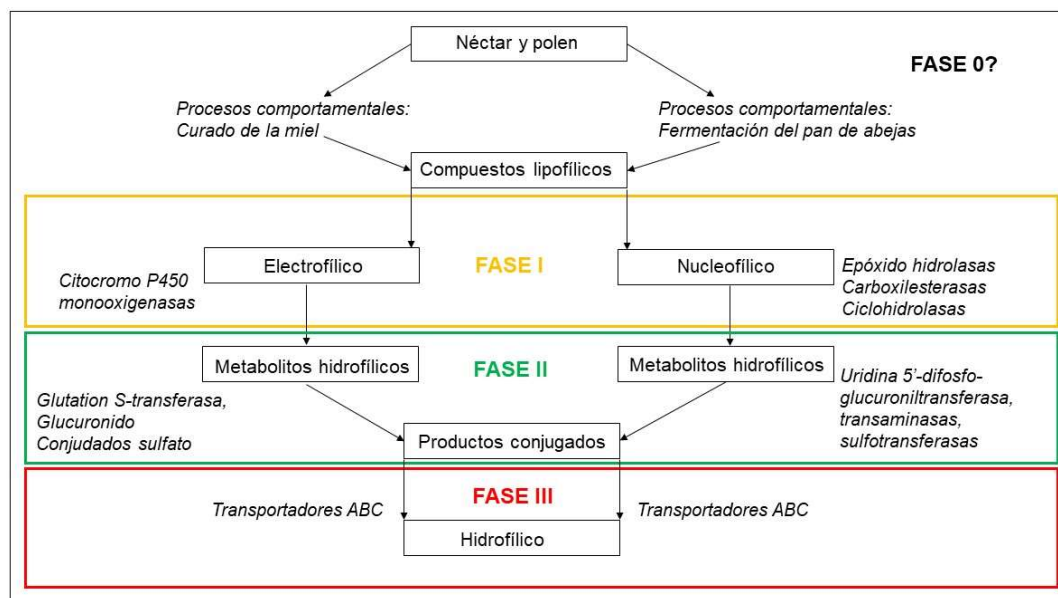


Figura 15. Esquema de los procesos de detoxificación en *Apis mellifera* y las enzimas asociadas en cada fase. Se propone la “fase 0”, en la cual constan los procesos relacionados con el procesamiento de los recursos alimenticios por las abejas que eliminan (o reducen la concentración) de los compuestos tóxicos previo al consumo¹

Estudios de nutrigenómica a partir de extractos metanólicos y etilacéticos de la miel, mostraron que algunos componentes de la misma pueden estimular la expresión de genes relacionados con las vías de detoxificación e inmunidad innata (Mao et al., 2013). Por lo tanto, esta fase tiene una importante relación con los nutrientes no tradicionales presentes en el polen y en el néctar.

Entre los fitoquímicos presentes en la mayoría de los pólenes y en la miel desde una diversidad de fuentes de néctar, se ha visto que la ingestión del ácido fenólico p-cumárico y el flavonol quercetina tiene un efecto en la sobre-expresión de una diversidad de genes de las vías de detoxificación, como los pertenecientes a la familia de las P450, tanto en abejas adultas como en larvas (Mao et al. 2011; 2013; 2015). A su vez, Liao et

¹ Modificado de Berenbaum y Johnson, 2015.

al. (2017) observaron que la suplementación con ácido *p*-cumárico y quercetina influye en la longevidad de *A. mellifera* expuestas a estrés por pesticidas. Negri et al. (2015) demostraron que la suplementación dietaria con la fitohormona ácido abscísico (ABA) aumenta las defensas inmunes de las abejas e incrementa la tolerancia a pesticidas. De esta manera, estos hallazgos abren un interesante campo para el estudio de nuevas moléculas, que suministradas como suplementos dietarios podrían generar abejas con mejores condiciones para hacer frente a los diversos estresores a los que se encuentran expuestas.

El ácido indol-3-acético (IAA) y el ácido giberélico (Ga3) son fitohormonas que regulan funciones fisiológicas fundamentales en las plantas (Simon y Petrásek, 2011; Wiesen et al. 2016). A pesar de su rol tan importante en plantas no existen reportes sobre su efecto en la salud de las abejas.

4.1.1 Objetivos particulares:

8. Determinar si la alimentación con ácido *p*-cumárico, ácido indol-3-acético o ácido giberélico provoca efectos letales en abejas.

9. Determinar si la alimentación con ácido *p*-cumárico, ácido indol-3-acético o ácido giberélico modifica la tolerancia de las abejas a los efectos letales ocasionados por los acaricidas de síntesis.

10. Determinar si la alimentación con ácido *p*-cumárico, ácido indol-3-acético o ácido giberélico modifica la actividad de enzimas que intervienen en diferentes vías de detoxificación en *A. mellifera*.

11. Determinar si la alimentación con ácido *p*-cumárico, ácido indol-3-acético o ácido giberélico modifica la expresión de genes que intervienen en vías de detoxificación en *A. mellifera*.

4.1.2 Hipótesis

H6: La alimentación con ácido indol-3-acético, ácido *p*-cumárico o ácido giberélico no produce efectos letales sobre las abejas.

A partir de H6 se predice que los niveles de toxicidad serán menores al 15% de mortalidad, valores de referencia establecidos por la bibliografía internacional de referencia (Beebook, Volumen 1, Cap III)

H7: La alimentación con ácido indol-3-acético, ácido *p*-cumárico o ácido giberélico aumenta la supervivencia de *A. mellifera* expuestas a acaricidas de síntesis.

Según la H7, se predice que la alimentación con ácido indol-3-acético, ácido *p*-cumárico o ácido giberélico estimula las vías de detoxificación en *A. mellifera*.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Obtención de abejas

Los experimentos fueron realizados con abejas obreras obtenidas del apiario experimental de Santa Paula, Mar del Plata. Las colonias a partir de las cuales se obtuvieron estaban sanas y no mostraron signos de enfermedad.

4.2.2 Determinación de la DL_{50} de acaricidas de síntesis

Para el cumafós se realizó el ensayo de determinación de la dosis que es letal para el 50% de los individuos expuestos (DL_{50}), en I) abejas recién emergidas (cuadros con cría cerrada fueron llevados al laboratorio y una vez que emergieron las abejas se comenzó con el experimento), y II) abejas nodrizas (recolectadas directamente de cuadros con cría abierta). Para el resto de los acaricidas en todos los experimentos se trabajó únicamente con abejas nodrizas siguiendo la metodología de Johnson et al. (2006).

Las soluciones de *tau*-fluvalinato, amitraz y cumafós se prepararon haciendo diluciones seriadas en etanol 96% o acetona el mismo día en que se realizó el ensayo. Cada concentración fue administrada en 1 µl de solución en el tórax de cada abeja obrera, usando una micropipeta (Figura 16). Los controles consistieron en la aplicación de 1 µl del solvente utilizado para la disolución del acaricida. Se trataron un total de 50 abejas por concentración, y se ubicaron en cápsulas de Petri (150 mm x 30 mm) en grupos de diez, se les administró *candy* y una esponja embebida en agua (Cap. II, pág. 34). Durante todo el experimento, las abejas se mantuvieron a 31° C y a 30-40% HR. A las 24 h de aplicado el *tau*-fluvalinato, cumafós o amitraz se registró mortalidad, las abejas fueron consideradas muertas si no se movían luego de un estímulo táctil.

En todos los ensayos se utilizaron *tau*-fluvalinato, cumafós y amitraz de grado analítico (Sigma Aldrich).



Figura 16. Administración tópica con micropipeta del *tau*-fluvalinato, amitraz o cumafós disuelto en 1 µl de solvente en el tórax de *A. mellifera*.

4.2.3 Impacto de la dieta en la susceptibilidad a tau-fluvalinato

Se evaluó el impacto de la dieta en la susceptibilidad al tau-fluvalinato, considerando la duración de los bioensayos y el tiempo de desarrollo de la tesis se trabajó solo con dicho acaricida utilizando al mismo como modelo de estudio.

Las abejas fueron confinadas en cajas (9,8 x 10 x 5,5 cm) en grupos de 40 individuos (Figura 17). Cada caja contenía dos alimentadores, que consistieron en pipetas Pasteur con la punta cortada, con las que se les administró jarabe de azúcar (2:1) en presencia o ausencia de las fitohormonas de estudio (Tabla 16) durante 5 días (tiempo sugerido para que la dieta tenga efectos en la fisiología de la abeja; Schmehl et al. (2014)). Durante el experimento las cajas fueron mantenidas a 31 °C y 30-40% HR.



Figura 17. Cajas utilizadas para los bioensayos de alimentación (9,8 x 10 x 5,5 cm). En cada caja se confinaron 40 individuos de *Apis mellifera*. El alimento (jarabe de azúcar preparado en agua 2:1, en sus distintos tratamientos) se administró *ad libitum* mediante pipetas Pasteur con un corte en su extremo.

Tabla 16. Dietas administradas en las cajas que contenían grupos de 40 individuos de *A. mellifera*. El jarabe de azúcar (jar) se preparó en agua (2:1).

Jarabe de Azúcar 2:1 +	Suplemento	Concentración	Nombre del tratamiento
	---	----	Control
	ácido <i>p</i> -cumárico	600 µM	Cum
	ácido indol-3-acético	2 µM	IAA 2 µM
		20 µM	IAA 20 µM
		200 µM	IAA 200 µM
	ácido giberélico	0,125 µM	Ga3 0,125 µM
		0,25 µM	Ga3 0,25 µM
		2,5 µM	Ga3 2,5 µM
		12,5 µM	Ga3 12,5 µM
		25 µM	Ga3 25 µM

Se examinó el impacto de la dieta en la supervivencia de obreras de *A. mellifera* expuestas a *tau*-fluvalinato. Por lo tanto, después de recibir la dieta correspondiente se expuso a las abejas a una aplicación tópica de la DL₅₀ de *tau*-fluvalinato, la cual fue previamente determinada (Capítulo IV, pág. 81). Para esto, 15 µg *tau*-fluvalinato/abeja fueron administrados tópicamente a 50 abejas de cada tratamiento, seleccionadas al azar de las cajas. También se dispuso de un grupo de abejas sin tratar, es decir abejas seleccionadas al azar de las cajas, las cuales recibieron tópicamente 1 µl de etanol 96%, el solvente utilizado para diluir el *tau*-fluvalinato. Luego de la exposición, las abejas fueron mantenidas en cápsulas de Petri en grupos de 10 individuos, teniendo un total de 50 abejas por tratamiento. Se administró *candy* como fuente de alimento. Durante todo el experimento, las abejas se mantuvieron a 31 °C y 30-40 % HR. La mortalidad se registró cada 24 h durante 3 días.

A partir de los resultados de mortalidad obtenidos, se tomaron muestras en Trizol de las abejas que recibieron una dieta suplementada con ácido Indolacético (IAA) 20 μ M luego de 72 h de exposición al *tau*-fluvalinato y su respectivo control, y se mantuvieron a -20°C para llevar a cabo estudios de expresión génica. También se tomaron muestras de las abejas que recibieron una dieta con IAA 20 μ M y las que recibieron Cum 600 μ M a las 24 h de la exposición al acaricida y su respectivo control, y se conservaron a -80 °C para su procesamiento para estudios enzimáticos.

4.2.4 Estudios de expresión génica

Se realizaron estudios de expresión génica para medir los niveles de expresión de los genes vinculados a vías de detoxificación. Se procedió a la homogeneización mecánica de abejas individuales en Trizol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EEUU), se trabajó con 3 réplicas por tratamiento.

4.2.4.1 Extracción de ARN

Las abejas se homogeneizaron individualmente en 700 μ l de Trizol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EEUU) y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Los homogenatos se centrifugaron a 12.000 g, durante 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Luego, se añadió cloroformo a 4 °C, se agitó por 20 seg y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 12.000 g por 15 min a 4°C. La fase superior acuosa se transfirió a un tubo libre de ARNasas. Se añadieron 500 μ l de isopropanol y 2 μ l de glicógeno 5 mg/ml, se mezcló con vortex 10 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4°C para precipitar el ARN. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1 ml de etanol 75% a 4 °C, luego se mezcló con vortex. La mezcla se centrifugó a 7.500 g durante 5 min a 4°C y se descartó el

sobrenadante. El ARN se resuspendió en 50 µl de agua libre de ARNasa, se mezcló vigorosamente y se incubó 5 min a 55°C.

4.2.4.2 Digestión con ADNasa

Para eliminar ADN genómico contaminante se llevó a cabo una digestión con ADNasa (Qiagen, Hilden, Alemania). Se adicionaron 2 µl de Buffer de ADNasa 10X, 0,5 µl de Inhibidor de Ribonucleasas Riboblock (Fermentas, Maryland, Estados Unidos), y 2 µl de ADNasa a 1,5 µg de ARN contaminado con ADN genómico y se llevó a un volumen de 20 µl con agua libre de ARNasas. Se realizó una incubación durante 30 min a 37°C, luego se agregaron 0,2 µl de EDTA 0,5 M y se incubó 5 min a 75°C para inactivar la ADNasa.

4.2.4.3 Retrotranscripción

La retrotranscripción se realizó utilizando la enzima MMLV (Invitrogen Corp.) a partir de 10 µl del ARN tratado con ADNasa en un volumen final de 20 µl. El ARN se incubó junto a 1,5 µl de cebadores *random hexamers* (160 ng/µl) a 65 °C durante 10 min y se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 min. Luego se agregaron 4 µl de *First Strand Buffer* 5X (Invitrogen Corp.), 2 µl de 0,1 M DTT, 1 µl de dNTPs 10mM, 0,5 µl de Inhibidor de ARNasas RNase Out (Invitrogen Corp.), 1 µl de retrotranscriptasa MMLV (Invitrogen Corp.) y se incubó la mezcla a 20°C durante 10 min, a 37°C por 50 min y a 70°C por 15 min para inactivar la retrotranscriptasa. El ADNc se conservó a -20°C hasta su utilización en los ensayos. En todas las reacciones de retrotranscripción se procesó un control sin ARN y un control negativo de retrotranscripción sin la enzima retrotranscriptasa.

4.2.4.4 Amplificaciones por PCR en tiempo real

Antes de realizar los estudios de expresión génica por PCR en tiempo real, todos los pares de oligonucleótidos fueron probados por PCR convencional con ADNc y los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa 2,5% usando un transiluminador U.V. y tinción con bromuro de etidio en buffer TBE 1X. Para todos los pares de cebadores, se corroboró que los negativos de retrotranscripción (sin retrotranscriptasa) no presentaran producto de PCR y que en todas las reacciones se haya amplificado el producto del peso molecular esperado. Una vez corroborado el protocolo de amplificación de los diferentes pares de cebadores por PCR convencional, se efectuaron las reacciones de PCR en Tiempo Real utilizando una mezcla preformada y optimizada de todos los componentes de la reacción (MyTaq HS, Bioline), exceptuando cebadores, moldes y agua, en un volumen final de 20 µl y por duplicado. La detección del producto amplificado se monitoreó en un equipo Rotor Gene Q (qiagen Hilden Alemania). El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 3 min, y 40 ciclos de 20 min a 95°C, 20 min a temperatura específica de *annealing* y 30 min a 72°C. Se realizó una búsqueda bibliográfica de genes de interés para el estudio de las vías de detoxificación y se seleccionaron varios oligonucleótidos que se detallan en la Tabla 17. Se utilizó a la B-actina, (Mutti et al., 2011) como *housekeeping* gen. Se efectuó una curva de disociación en cada caso, para corroborar que se estaba amplificando el producto de tamaño esperado y asegurar que no se formen dímeros de oligonucleótidos que pudieran estar interfiriendo en la lectura de fluorescencia del termociclador. Todas las determinaciones se efectuaron con una concentración de cebadores de entre 448 a 900 mM.

Tabla 17. Secuencia de los oligonucleótidos Forward (fw) y reverse (rv) utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real y tamaño del producto de PCR.

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA 5' – 3'	TAMAÑO DE PRODUCTO DE PCR	REFERENCIA
citocromo P450 9Q3 (CYP9Q3)	GTAGGGAGAAGTTGGGCACC	122 pb	Vannette et al. (2015)
	GCTACGTTCTCGACGGTCAT		
citocromo P450 6AS4 (CYP6AS4)	TCGTTTTGCGCGATCTTGAC	102 pb	Vannette et al. (2015)
	AAAAAGGTTCTGGCTCGTTCTG		
Carboxilesterasa (CRBXase)	ACATTTCTGGGGCATCTCAC	127 pb	Naggar et al. (2015)
	CTGGTCATTCTGTTCCAAGGT		
β -actina	TGCCAACACTGTCCTTTCTG	156 pb	Mutti et al. (2011)
	AGAATTGACCCACCAATCCA		

Los cambios en la expresión génica de los genes mencionados se determinaron mediante el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001), donde se compara la expresión del gen en cuestión (gen diana) en la muestra dada con la expresión del gen de referencia (beta actina de *A. mellifera*) en la misma muestra. Se normalizó la cantidad o CT (valores umbral de ciclo) del gen diana respecto al gen referencia (ΔCT). Se compararon los ΔCT de cada muestra experimental ($\Delta CT, r$), con el ΔCT de la muestra calibrador ($\Delta CT, cb$): $\Delta\Delta CT$. La cantidad relativa en cada muestra se definió mediante la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

4.2.5 Estudios enzimáticos

4.2.5.1 Homogenización de tejidos

La extracción enzimática a partir de abejas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Kwon et al. (2010). Se procedió a la toma de muestras de las abejas tanto del grupo control como de los distintos tratamientos, y el abdomen y la cabeza fueron separados para ser procesados en forma distinta según la enzima a estudiar. El aguijón y la glándula del veneno fueron removidos del abdomen (Papadopoulos et al., 2004). Se procesaron cinco réplicas para cada tratamiento. Cada abdomen se homogeneizó en (1:10 peso/volumen) buffer de extracción (0.1 M Tris-HCl, pH 7.8) y el homogenato se centrifugó a 10.000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó como fuente

de enzimas para la determinación de actividad de glutatión-S transferasa (GST), citocromo P450 monoxigenasas (P450) y glutatión reductasa (GR). La fuente enzimática para determinar la actividad de la acetilcolinesterasa fue obtenida de la homogeneización de cada cabeza de abeja, para lo cual se utilizó el mismo buffer de homogeneización descrito arriba, excepto que además contenía 0,1 % Triton X-100. La relación peso/volumen usada fue de 1:15. El homogenato se centrifugó a 10.000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido de las muestras de abdomen y de las cabezas se guardó a -80 °C hasta el posterior análisis de determinación de proteínas y actividad enzimática usando un espectrofotómetro de microplacas (Epoch Bio Tek). Todos los reactivos utilizados fueron comprados en Sigma-Aldrich.

4.2.5.2 Determinación de proteínas

La concentración de proteínas totales fue determinada usando el método de Bradford (1976). Dicho método consiste en la unión del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* a las proteínas. La unión del colorante a las proteínas provoca un cambio en la absorción máxima de la señal de 465 a 595 nm, y es el aumento en la absorción a 595 nm lo que se monitorea. La albumina de suero bovino (BSA) fue utilizada como estándar de proteína.

4.2.5.3 Actividad Glutatión-S-Transferasa

La actividad Glutatión-S-Transferasa (GST) se midió monitoreando la absorbancia a 340 nm generada por la conjugación de 25mM de glutatión reducido (GSH) con 50 mM de 1-cloro-2,4 dinitrobenzono (CDNB), disueltos en 0,1 M de fosfato de potasio (pH 7) con el extracto enzimático durante 4 min a 25 °C (Habig y Jakoby, 1981).

4.2.5.4 Actividad Glutación Reductasa

Para estimar la actividad Glutación Reductasa (GR) se midió la oxidación de NADPH a 340 nm durante 5 min en una mezcla de reacción (100 µl) que contenía 0,2 M de fosfato de sodio (pH 7,5) y 36 µl de extracto enzimático. En el momento de la lectura se adicionaron 20 µl de Glutación Oxidado (10 mM) y 20 µl de NADPH (1 mM) (Gallagher et al., 1992).

4.2.5.5 Actividad Acetil Colinesterasa

La actividad de AChE se midió incunbando el extracto enzimático (ca. 4,5 µg de proteínas) con 125 µM de 5,5-dithio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB, Sigma) y 100 µM de yoduro de acetilcolina (ATChI) a 25 °C por 30 min, a una absorbancia de 415 nm (modif. de Ellman et al., 1961).

4.2.5.6 Actividad Monooxigenasa P450

Para medir la actividad Monooxigenasa P450 (P450) el extracto enzimático (20 µg de proteína) fue incubado con 0.4 mM 7-etoxicumarin (7-EC) y 1 mM NADPH durante 30 min a 30 °C en pocillos de microplacas de 96-pozas. La fluorescencia de NADPH fue removida con el agregado de 10 µl de glutatión oxidado (100 mM en agua) y 20 µl de glutatión reductasa (1 U) que oxida el NADPH a NADP⁺. Luego de 10 min a temperatura ambiente, la reacción fue finalizada con 125 µl de acetonitrilo 50% en 50 mM buffer Tris (pH 10). La cantidad de 7-hidroxycumarin liberado durante la incubación fue cuantificada en un fluorímetro de microplacas (excitación: 390 nm; emisión: 465 nm) (Chauret et al., 1999).

4.2.6 *Análisis estadístico*

La DL₅₀ y los intervalos de confianza al 95%, como es establecido por USEPA (1986), fueron calculados usando el software EPA (versión 1.5) como recomienda Lindberg et

al. (2000). Los valores de mortalidad fueron ajustados de acuerdo a Abbott (1925) como una función de la mortalidad natural.

Para determinar diferencias en la supervivencia entre los distintos grupos de dietas y el control, se realizó un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y log-rank, utilizando las dietas y exposición a acaricida como variables. La mortalidad de abejas para cada condición evaluada a los distintos tiempos fue comparada utilizando un test de chi-cuadrado.

El análisis de los niveles de ARNm de los genes estudiados se realizó mediante el test ANOVA y Tukey ($p < 0,05$).

Las diferencias de concentración de proteínas y actividades enzimáticas entre tratamiento fueron testeadas por medio de análisis de la varianza para muestras dependientes: ANOVA Friedman y test de t apareados para comparación de a pares. En todos los casos el nivel de significancia fijado fue de 0.05 (Zar, 1984).

Los análisis se realizaron con el programa InfoStat versión 2017 (Di Rienzo et al. 2017).

4.3 Resultados

4.3.1 Impacto de la dieta en la susceptibilidad a acaricidas de síntesis

4.3.1.1 Determinación de la DL_{50} del cumafós en abejas recién emergidas y nodrizas

Se realizó un primer ensayo en el que se compararon los valores de DL_{50} del cumafós obtenidos para abejas recién emergidas y para abejas nodrizas (Tabla 18). Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas entre la mortalidad ocurrida a 24, 48 y 72 h ($p > 0.05$) al comparar ambos ensayos.

Tabla 18. DL₅₀ e intervalos de confianza al 95% (CI) estimados de cumafós en abejas recién emergidas y en abejas nodrizas.

	Tiempo (h)	DL ₅₀ µg/abeja	CI
Cumafós	24	26,37	10,47- 53,87
<i>Abejas recién emergidas</i>	48	7,16	4,14-9,64
	72	7,59	3,61-10,47
Cumafós	24	25,76	21,11-30,75
<i>Abejas nodrizas</i>	48	12,01	9,33-14,34
	72	9,99	6,38-12,52

4.3.1.2 Determinación de la DL₅₀ de amitraz y *tau*-fluvalinato en abejas nodrizas

En la Tabla 19 se muestran los valores de DL₅₀ obtenidos en abejas nodrizas para los diferentes tiempos de exposición a los acaricidas de síntesis: amitraz y *tau*-fluvalinato. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre la mortalidad ocurrida a 24, 48 y 72 h ($p > 0,05$) para *tau*-fluvalinato, mientras que para el amitraz hubo diferencias significativas en el valor de la DL₅₀ de las 24 h con respecto a las DL₅₀ de las 48 y 72 h ($p < 0,05$).

Tabla 19. DL₅₀ e intervalos de confianza al 95% (CI) estimados para amitraz y *tau*-fluvalinato, en abejas nodrizas.

	Tiempo (h)	DL ₅₀ µg/abeja	CI
amitraz	24	33,76	27,09-42,35
	48	18,63	14,70-22,83
	72	14,28	11,11-17,39
<i>tau</i>-fluvalinato	24	15,00	12,50-18,07
	48	15,21	11,86-18,09
	72	15,82	12,65-20,13

4.3.1.3 Determinación de la toxicidad de fitomoléculas administradas en la dieta e impacto de la dieta en la susceptibilidad a *tau*-fluvalinato de abejas nodrizas

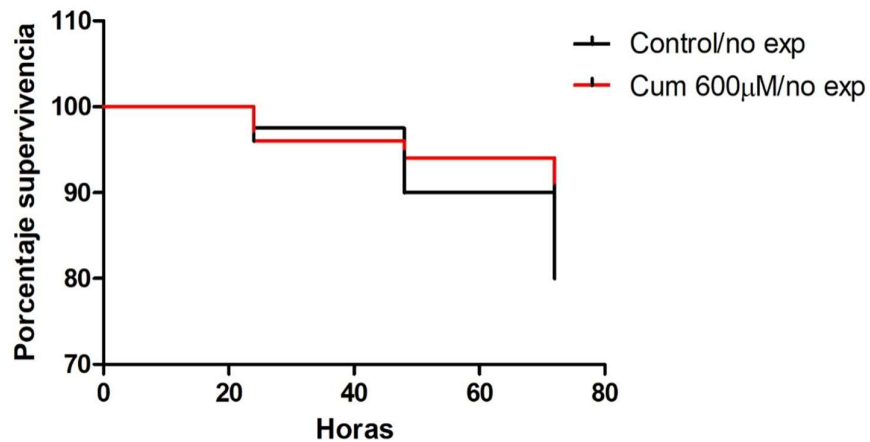
Las dietas con las diferentes fitohormonas no fueron tóxicas en la mayoría de los casos (Figura 18, 19, 20). El IAA a la concentración de 200 μ M tuvo un efecto negativo en la supervivencia de las abejas, observándose mayor mortalidad con respecto a las que recibieron jarabe de azúcar solo (Figura 19.a). Para el resto de las concentraciones probadas de IAA, así como para Cum y Ga3 no se observaron efectos en la supervivencia de las abejas nodrizas (Figura 18, 19, 20).

Para determinar si la suplementación con fitohormonas en la dieta modifica la supervivencia de abejas luego de la exposición a *tau*-fluvalinato, se monitoreó la mortalidad de abejas que recibieron las diferentes dietas, hasta 72 h después de la exposición con el acaricida. Los resultados indicaron que la suplementación con 20 μ M de IAA en la dieta aumentó la supervivencia de las abejas expuestas al *tau*-fluvalinato (Figura 19 b). El Cum tuvo un efecto similar, aunque en menor magnitud y más tardío. En este sentido, en las abejas suplementadas con Cum los efectos en la supervivencia se observaron a las 72 h de la aplicación del *tau*-fluvalinato ($p < 0.05$).

Las abejas que recibieron una dieta suplementada con Ga3 en todas las concentraciones ensayadas no mostraron diferencias en la supervivencia con respecto a las abejas que recibieron dieta control (Figura 20 a). Sin embargo, frente a la exposición a *tau*-fluvalinato, si bien a baja concentración Ga3 no tuvo efecto en la supervivencia de las abejas, las que recibieron una dieta suplementada con 25 μ M de Ga3 mostraron una menor supervivencia que las que recibieron una dieta con jarabe solo (control) (Figura 20 b). Algo similar se observó en el grupo de abejas que recibió una dieta suplementada con 200 μ M de IAA, las cuales mostraron una menor supervivencia a la exposición al *tau*-fluvalinato en comparación con las abejas que recibieron una dieta solo con jarabe (Figura 19 b). Es decir que tanto el IAA como el Ga3

a altas concentraciones mostraron tener un efecto sinérgico con el *tau*-fluvalinato, lo cual resultó en una menor supervivencia. En base a estos resultados se descartó al Ga3 en los estudios de expresión génica y actividad enzimática.

a)



b)

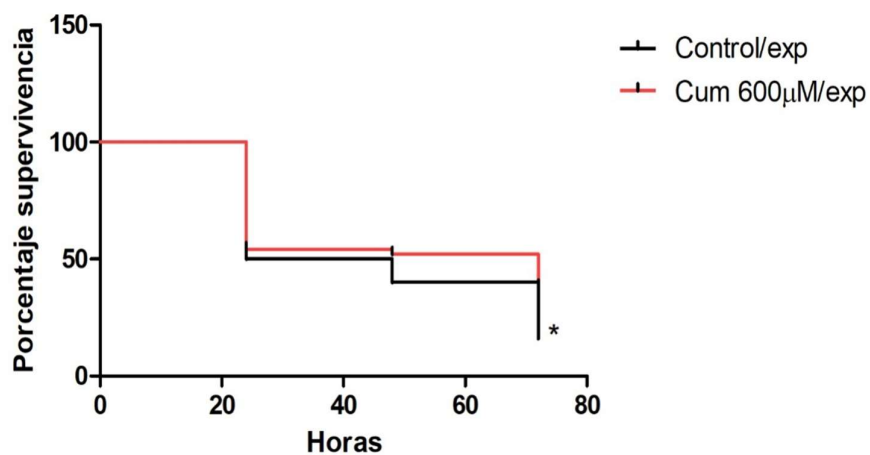
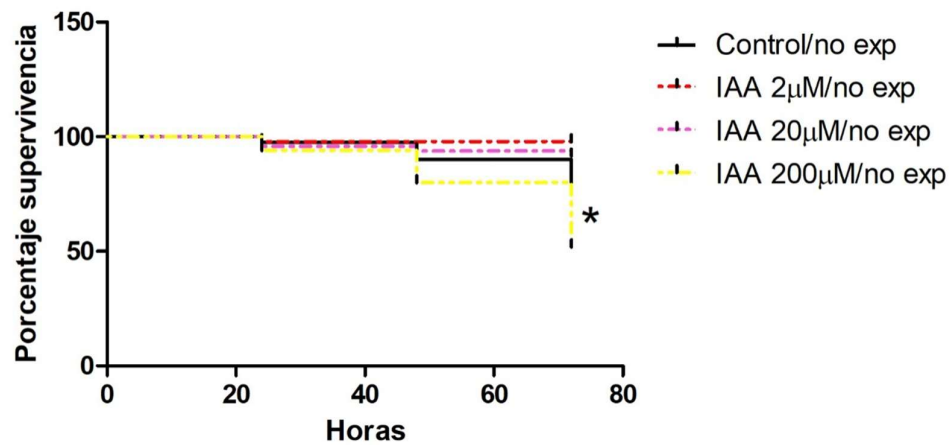


Figura 18. Gráfico de supervivencia Kaplan-Meier de abejas nodrizas alimentadas con diferentes dietas. a) abejas alimentadas con jarabe de azúcar (Control) o jarabe de azúcar suplementado con ácido p-cumárico (Cum) no expuestas a *tau*-fluvalinato; b) abejas alimentadas con jarabe de azúcar (Control) o jarabe de azúcar suplementado con ácido p-cumárico (Cum) expuestas a la DL₅₀ de *tau*-fluvalinato. “*” indica diferencia significativa con respecto al control (Test de chi cuadrado, $p < 0.05$).

a)



b)

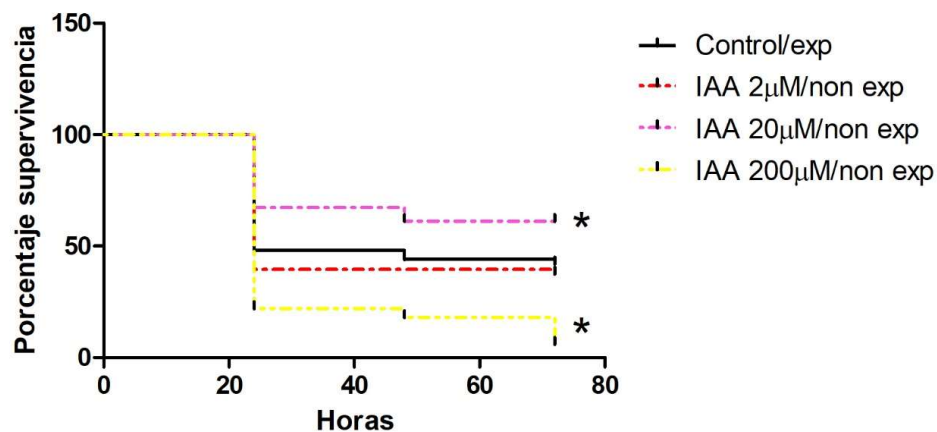
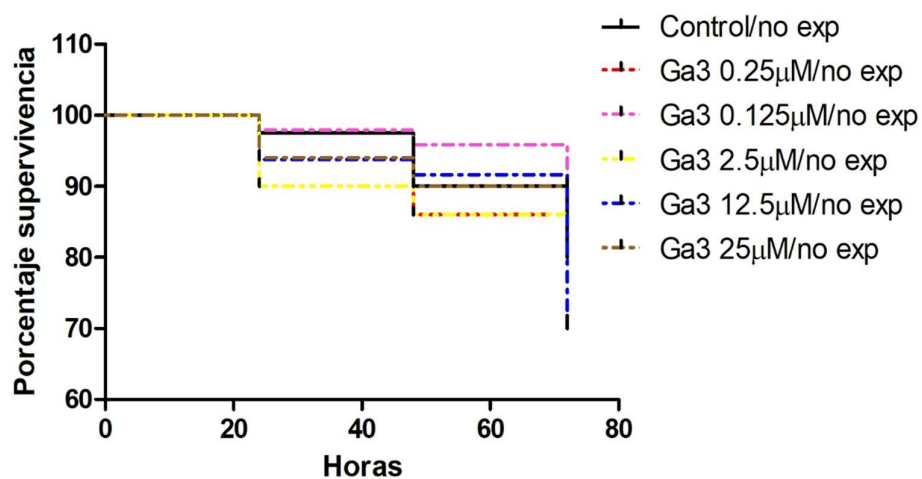


Figura 19. Gráfico de supervivencia Kaplan-Meier de abejas nodrizas alimentadas con diferentes dietas. a) abejas alimentadas con jarabe de azúcar (Control) o jarabe de azúcar suplementado con ácido indolacético (IAA) no expuestas a *tau*-fluvalinato; b) abejas alimentadas con jarabe de azúcar (Control) o jarabe de azúcar suplementado con ácido indolacético (IAA) expuestas a la DL₅₀ de *tau*-fluvalinato. “*” indica diferencia significativa con respecto al control (Test de Kaplan-Meier, $p < 0.05$).

a)



b)

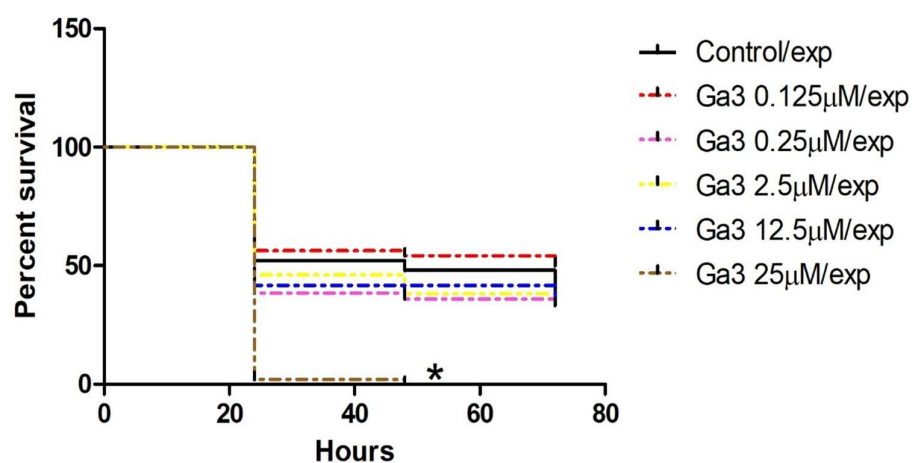


Figura 20. Gráfico de supervivencia Kaplan-Meier de abejas nodrizas alimentadas con diferentes dietas. a) abejas alimentadas con jarabe de azúcar (Control) o jarabe de azúcar suplementado con ácido giberélico (Ga3) no expuestas a *tau*-fluvalinato; b) abejas alimentadas con jarabe de azúcar (Control) o jarabe de azúcar suplementado con ácido giberélico (Ga3) expuestas a la DL_{50} de *tau*-fluvalinato. “*” indica diferencia significativa con respecto al control (Test de Kaplan-Meier, $p < 0.05$).

4.3.2 Expresión de genes de vías de detoxificación

Se evaluaron los niveles de ARNm de genes involucrados en vías de detoxificación (citocromo P450 9Q3 (CYP9Q3), citocromo P450 6AS4 (CYP6AS4) y carboxilesterasa (CRBXase)), todos de la fase I de detoxificación (Jhonson y Berembaum, 2015), en abejas nodrizas expuestas y no expuestas a la DL_{50} de tau-fluvalinato y se estimó el efecto de la suplementación con IAA. Para los estudios de PCR en tiempo real se eligió el método de cuantificación relativa, utilizándose la B-actina como gen housekeeping para el análisis de expresión génica⁹ (Figura 21).

La optimización de los ensayos por PCR de tiempo real de cada gen se detallan en el Apéndice 4.

Los niveles de expresión de ARNm de los genes que codifican para CYP9Q3, CYP6AS4 y CRBXase no evidenciaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre las abejas que recibieron la dieta con IAA y expuestas y no expuestas al tau-fluvalinato con respecto a las que recibieron la dieta control. Sin embargo, se observó una tendencia al aumento en los niveles de transcritos del gen CRBXase y en menor medida del gen CYP6AS4 en las abejas que recibieron la dieta suplementada con IAA (Figura 21. b y C). A su vez, se observó una tendencia al aumento en los niveles de transcritos del gen CYP9Q3 frente a la exposición al tau-fluvalinato (Figura 21.a).

⁹ No existieron diferencias en la expresión del gen B-actina por lo que se utilizó como estándar interno

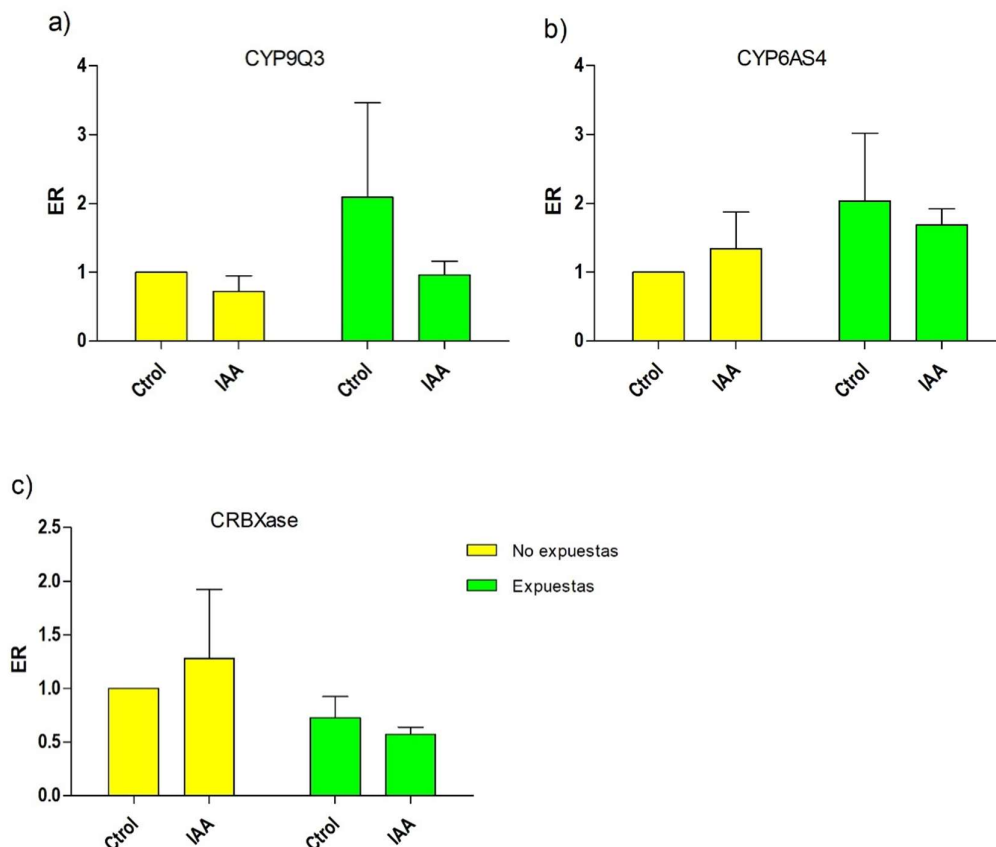


Figura 21. Niveles de expresión relativa (ER) de los genes que codifican para citocromo P450 9Q3 (CYP9Q3), citocromo P450 6AS4 (CYP6AS4) y carboxilesterasa (CRBXase) de abejas nodrizas alimentadas con jarabe de azúcar (Ctrol) o ácido indolacético (IAA) y expuestas o no expuestas a la DL_{50} de *tau*-fluvalinato. No se observaron diferencias significativas en ningún caso, ($p > 0.05$), test ANOVA y Tukey.

4.3.3 Concentración de proteínas

La Figura 22 muestra la concentración de proteínas en abdómenes y cabezas de abejas nodrizas suplementadas con IAA y Cum expuestas a *tau*-fluvalinato. Los resultados muestran que la suplementación no produjo cambios en la cantidad de proteínas totales de las abejas en comparación con las que recibieron dieta control ($p > 0.05$). Sin embargo, las abejas que recibieron solo jarabe y que luego fueron expuestas a *tau*-fluvalinato mostraron una mayor concentración de proteínas que las abejas que recibieron solo jarabe y que no fueron expuestas a dicho acaricida ($p < 0.05$).

(Figura 22.a). A su vez, se observó que el contenido de proteínas fue mayor en el abdomen que en la cabeza ($p<0.05$) (Figura 22.b).

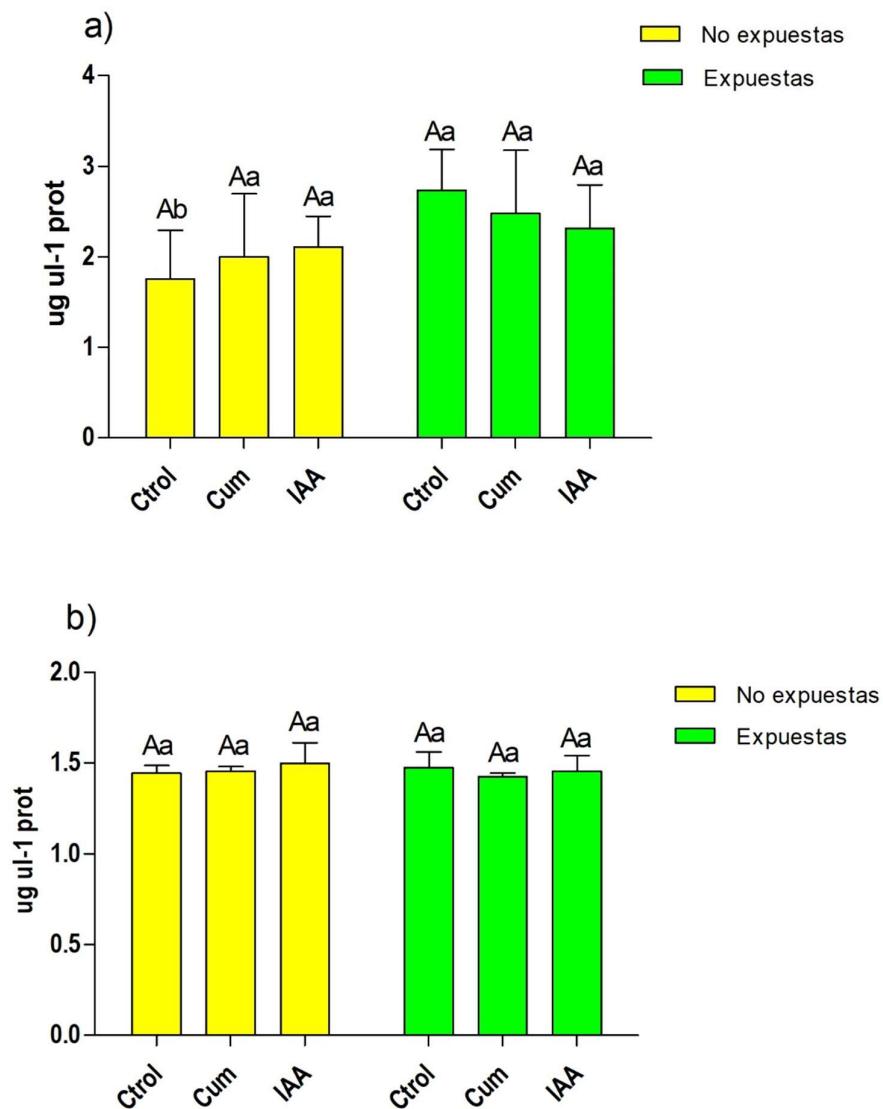


Figura 22. Concentración de proteínas en abdómenes (a) y cabezas (b) de abejas alimentadas con dieta de jarabe de azúcar 2:1 (Ctrol) o con jarabe de azúcar suplementado con ácido p-cumárico (Cum) o con ácido indolacético (IAA) durante 5 días y que luego fueron expuestas o no a la DL₅₀ de tau-fluvalinato durante 24 hs. Las letras en mayúsculas indican diferencias estadísticas ($p<0.05$) en la concentración de proteínas entre las diferentes dietas (Ctrol, Cum o IAA) para cada condición expuestas o no expuestas; las letras minúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) en la concentración de proteínas entre abejas expuestas y no expuestas al tau- fluvalinato en cada condición dietaria.

4.3.4 Detoxificación y defensa antioxidante

4.3.4.1 Actividad Glutación-S-Transferasa

Los resultados obtenidos para la actividad enzimática de la GST se muestran en la Figura 23. Al comparar las abejas que recibieron distintas dietas se puede observar que las que recibieron dieta suplementada con IAA presentaron menor actividad GST que las abejas que recibieron dieta suplementada con Cum y las que solo recibieron jarabe. Cuando las abejas fueron expuestas al *tau*-fluvalinato no se observaron diferencias significativas en la actividad de la GST entre los tres distintos grupos de dietas (Figura 23). Sin embargo, al comparar la actividad enzimática GST en grupos de abejas que recibieron el mismo tipo de dieta, pero expuestas y no expuestas al *tau*-fluvalinato se observaron diferencias en las que recibieron una dieta suplementada con Cum, siendo el grupo que fue expuesto a *tau*-fluvalinato el que presentó menor actividad GST respecto al grupo que no fue expuesto al acaricida ($p < 0.05$). Para el resto de las dietas no se observaron diferencias entre las abejas tratadas y sin tratar con *tau*-fluvalinato (Figura 23).

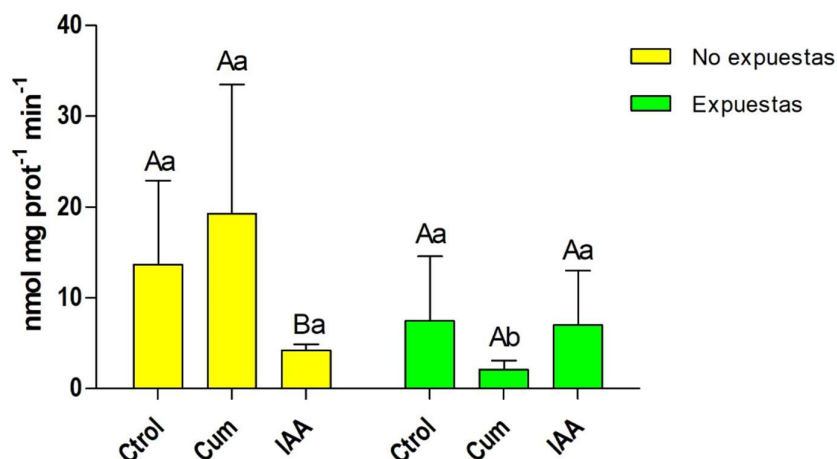


Figura 23. Actividad de Glutación-S-Transferasa (GST) en abdómenes de abejas nodrizas alimentadas con jarabe de azúcar (Ctról), ácido p-cumárico (Cum) o ácido indolacético (IAA), y expuestas o no expuestas a la DL_{50} de tau-fluvalinato. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas entre abejas expuestas y no expuestas a la DL_{50} de tau-fluvalinato ($p < 0.05$); las mayúsculas indican diferencias significativas entre abejas que recibieron diferentes dietas ($p < 0.05$).

4.3.4.2 Actividad Glutación Reductasa

Los resultados de la actividad enzimática GR se muestran en la Figura 24. Se puede observar que las abejas que recibieron la dieta suplementada con Cum presentaron mayor actividad GR ($p < 0.05$) que las abejas que recibieron la dieta control y las que recibieron una dieta suplementada con IAA, esto se observó tanto para el grupo de abejas expuestas al tau-fluvalinato como para el grupo de abejas no expuestas. Por otra parte, no se observaron diferencias al comparar los grupos de abejas expuestas y no expuestas al tau-fluvalinato dentro de cada grupo de dieta.

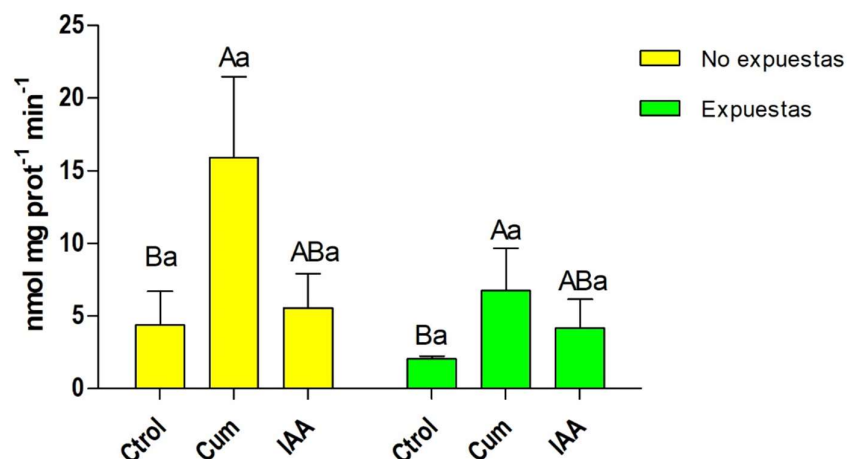


Figura 24. Actividad Glutación Reductasa (GR) en abdómenes de abejas nodrizas alimentadas con jarabe de azúcar (Ctrol), ácido p-cumárico (Cum) o ácido indolacético (IAA), y expuestas o no expuestas a la DL₅₀ de *tau*-fluvalinato. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas entre abejas expuestas y no expuestas a la DL₅₀ de *tau*-fluvalinato ($p \leq 0.05$); las mayúsculas indican diferencias significativas entre abejas que recibieron diferentes dietas ($p \leq 0.05$).

4.3.4.3 Actividad Monooxygenasa P450

Los resultados de la actividad enzimática de la P450 se muestran en la Figura 25. No se observaron diferencias significativas al comparar los distintos grupos de dietas, sin embargo, se observó una tendencia al incremento en la actividad P450 en los grupos de abejas que recibieron la dieta suplementada con IAA con respecto a las que recibieron una dieta control y, en menor medida, en el grupo que recibió una dieta suplementada con Cum. Esto se observó tanto para el grupo de abejas expuestas al *tau*-fluvalinato como para el grupo de abejas no expuestas (Figura 25).

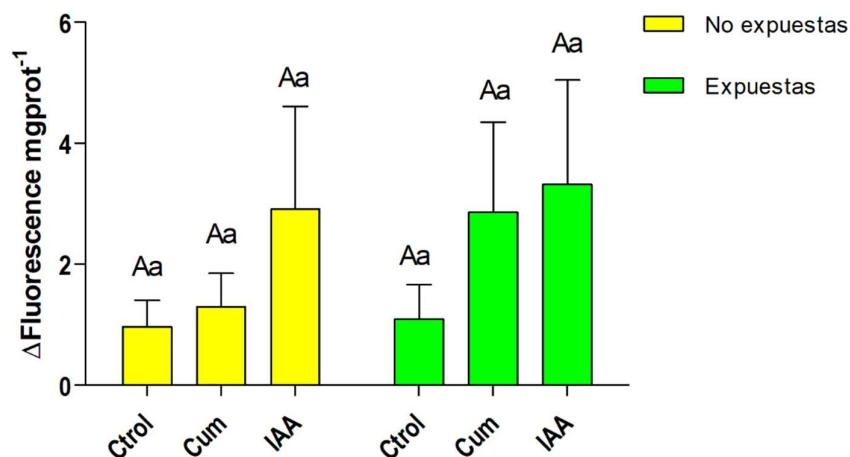


Figura 25. Actividad monooxygenasa P450 (P450) en abdómenes de abejas nodrizas alimentadas con jarabe de azúcar (Ctrol), ácido p-cumárico (Cum) o ácido indolacético (IAA), y expuestas o no expuestas a la DL₅₀ de *tau*-fluvalinato. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas entre abejas expuestas y no expuestas a la DL₅₀ de *tau*-fluvalinato ($p < 0.05$); las mayúsculas indican diferencias significativas entre abejas que recibieron diferentes dietas ($p < 0.05$).

4.3.4.4 Actividad Acetil Colinesterasa

Los resultados de la actividad AChE en abejas suplementadas con las diferentes dietas y expuestas a *tau*-fluvalinato se muestra en la Figura 26. Los resultados muestran que ni la suplementación dietaria con IAA y ácido p-cumárico ni la exposición al *tau*-fluvalinato produjeron una alteración en la actividad de AChE.

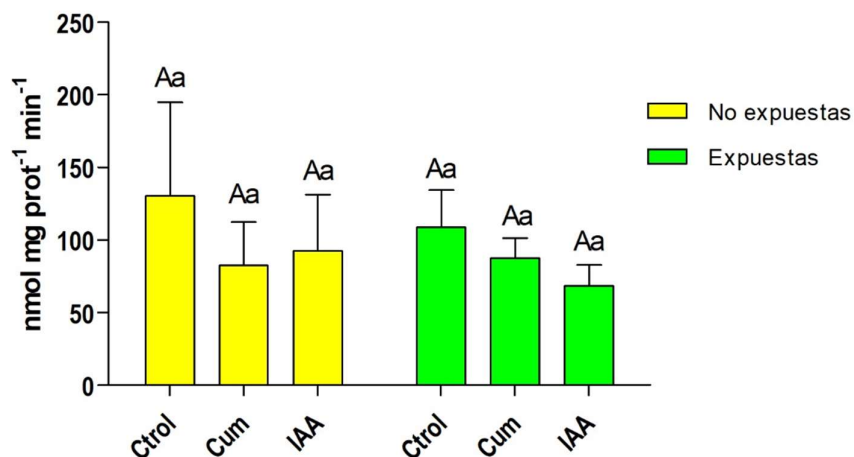


Figura 26. Actividad Acetil Colinesterasa (AChE) en cabezas de abejas nodrizas alimentadas con jarabe de azúcar (Ctrol), ácido p-cumárico (Cum) o ácido indolacético (IAA), y expuestas o no expuestas la DL_{50} de *tau*-fluvalinato. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas entre abejas expuestas y no expuestas a la DL_{50} de *tau*-fluvalinato ($p < 0.05$); las mayúsculas indican diferencias significativas entre abejas que recibieron diferentes dietas ($p < 0.05$).

4.4 Discusión

En este estudio se observó que la suplementación de la dieta con fitomoléculas como ácido indolacético (IAA) y ácido p- cumárico (Cum) puede aumentar la supervivencia de abejas nodrizas expuestas a *tau*-fluvalinato. Considerando el efecto negativo del uso de acaricidas de síntesis, estos resultados tienen una implicancia directa como posible estrategia de mitigación. Este hallazgo es consistente con resultados obtenidos en otros estudios. En este sentido, Schmehl et al. (2014) observaron que la resistencia al pesticida clorpirifós se incrementa en relación a la complejidad nutricional de la dieta. Las abejas alimentadas con polen tuvieron una mayor supervivencia a la exposición a este pesticida en relación a abejas alimentadas con proteína de soja o jarabe de azúcar. A su vez, Liao et al. (2017) mostraron que el Cum aumenta la tolerancia de las abejas a dos insecticidas piretroides, demostrando que los fitoquímicos presentes en la dieta

natural de las abejas pueden tener efectos en la supervivencia de las mismas y disminuyendo el estrés ocasionado por los mismos.

Asimismo, los resultados de la presente tesis mostraron que es crucial determinar las concentraciones a las cuales los efectos de las fitomoléculas son positivos en las abejas dado que se observó que concentraciones elevadas de las mismas ejercerían un efecto tóxico (ej. IAA en concentraciones de 200 μ M). Los resultados también mostraron que dependiendo del tipo de fitomolécula que se administre en la dieta, los efectos pueden ser variables. Por ejemplo, el ácido giberélico no disminuyó la supervivencia de abejas expuestas a *tau*-fluvalinato, excepto a la concentración más alta ensayada (25 μ M). Se deberá profundizar la evaluación de los posibles efectos de una suplementación dietaria con fitomoléculas en la supervivencia de abejas expuestas a otros acaricidas de síntesis como amitraz o cumafós, que poseen diferentes mecanismos de acción que el *tau*-fluvalinato.

Además del valor nutricional, los fitoquímicos presentes en la dieta natural de las abejas pueden ejercer un efecto en las vías de detoxificación de xenobióticos (Berenbaum y Johnson, 2015). Esto podría explicar los resultados observados en cuanto al aumento de la supervivencia de las abejas frente a *tau*-fluvalinato cuando se alimentaron con dietas suplementadas con IAA y Cum en concentraciones de 20 y 600 μ M respectivamente. El Cum se encuentra naturalmente presente en la miel y el polen y produce un aumento en la cantidad de transcriptos asociados a vías de detoxificación, incluyendo la P450 y genes de esterasas (Mao et al., 2013).

Luego de observar cambios en la supervivencia a *tau*-fluvalinato en las abejas que recibieron dietas suplementadas con IAA o Cum se estudiaron los efectos de las dietas en los mecanismos de detoxificación, para poder determinar si existe una mayor supervivencia debido una modificación en los mismos. Es así que se estudió a nivel de expresión génica y se realizaron estudios de actividad enzimática. Dentro de los genes estudiados se incluyó al CYP9Q3, el cual no presentó cambios significativos en sus

niveles de expresión, en abejas que recibieron una dieta suplementada con IAA. Sin embargo, se observó una tendencia al aumento en los niveles de transcritos de dicho gen en el grupo de abejas expuestas al *tau*-fluvalinato, lo cual estaría en concordancia con resultados de otros autores (Mao et al., 2011; Schmehl et al., 2014). Tampoco se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de CYP6AS4 y CRBXase en las abejas que recibieron una dieta suplementada con IAA con respecto a las que recibieron una dieta control, si bien se registró una tendencia al incremento en los niveles de transcritos de CRBXase y en menor medida, de CYP6AS4.

En *A. mellifera*, las carboxilasas participan en el metabolismo de xenobióticos, incrementándose su actividad frente a la exposición de orgafofosforados, neonicotinoides y piretroides (Carvalho et al., 2013). Estudios adicionales deben ser realizados para determinar la implicancia de otros genes que codifican para enzimas pertenecientes a las distintas fases de detoxificación de xenobióticos. A su vez, un factor a tener en cuenta en este tipo de estudios es el tiempo transcurrido entre la exposición al xenobiótico y la toma de muestras para los estudios de expresión génica. En el presente estudio las mismas se tomaron luego de 72 h de exposición al acaricida. Recientemente Gashout et al. (2018) realizaron un estudio en el que evaluaron la expresión de distintos genes, luego de la exposición a acaricidas sintéticos y orgánicos. Las mediciones se realizaron en abejas tomadas a distintos tiempos luego de la exposición a los acaricias y se observó que los niveles de expresión variaron en los distintos tiempos de muestreo, con una dinámica distinta según el gen en cuestión.

En el presente estudio se observó que la suplementación con IAA o Cum en la dieta no induce cambios en la concentración de proteínas ni en abdomen ni en cabeza. Asimismo, la exposición al *tau*-fluvalinato aumentó la concentración de proteínas en el abdomen de las abejas que recibieron dieta con jarabe. Estos resultados podrían indicar que ni la síntesis ni la degradación de proteínas estarían afectadas por la dieta, aunque sí por la exposición al *tau*-fluvalinato. Feazel-Orr et al. (2016) no observaron cambios en el contenido proteico frente a la exposición al *tau*-fluvalinato a las 2 y 4 semanas

posteriores a la aplicación. No obstante, Reeves et al., (2018) mostraron que la exposición tanto a *tau*-fluvalinato como a cumafós tendrían un impacto en los indicadores de nutrición como son las proteínas y los hidratos de carbono. Esta contraposición de resultados podría deberse a que el análisis del contenido proteico se llevó a cabo en diferentes momentos posteriores a la aplicación.

En nuestro estudio se demostró que la suplementación con IAA y Cum en la dieta de abejas nodrizas causa cambios significativos en la actividad de enzimas de detoxificación. La detoxificación mediada por las P450 es central para la tolerancia y resistencia a pesticidas en muchos insectos plaga (Feyereisen, 2005; Li et al., 2007), incluyendo tolerancia a insecticidas piretroides en las abejas (Pilling et al., 1995; Johnson et al., 2006). La suplementación de la dieta con IAA y Cum mostró generar un incremento de la actividad de las P450, tanto en el grupo de abejas expuestas al *tau*-fluvalinato como en el grupo de no expuestas. Estos resultados van en la misma línea de lo observado por Mao et al. (2013) quienes describen que la suplementación con Cum causa un aumento en el nivel de transcritos de los genes CYP9Q, con una significancia funcional en cuanto a un incremento en el metabolismo del cumafós.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la suplementación dietaria con Cum incrementó la actividad de GR en abejas expuestas y no expuestas al *tau*-fluvalinato, mientras que disminuyó la actividad de GST en abejas expuestas y no expuestas. Las abejas que recibieron una dieta suplementada con IAA no mostraron cambios en la actividad de GR con respecto las abejas que recibieron la dieta con jarabe solo.

La enzima GST está involucrada en la detoxificación de una gran variedad de compuestos tóxicos por conjugación de los mismos al glutatión y, en consecuencia, facilita su remoción del organismo (Jakoby, 1985; Lee, 1991; Hinton et al., 1995). Complementaria a la función en la detoxificación a través de la conjugación, GST también tiene actividad peroxidasa, proporcionando así una función de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mannervik, 1985). La disminución en la actividad

de GST mostrada en las abejas alimentadas con Cum y expuestas a *tau*-fluvalinato podría estar relacionada con la inhibición de la enzima vinculada con la presencia de acaricida ya que los niveles de proteína total no cambiaron en esta condición. Por otra parte, la enzima GR cataliza la reducción de disulfuro de glutatión (GSSG) a la forma sulfhidrilo GSH, que como se mencionó anteriormente es una molécula crítica para la resistencia al estrés oxidativo y mantenimiento de un entorno reductor en la célula. Por lo tanto, los resultados indicarían que el ácido p-cumárico podría aumentar la relación GSH/GSSG proporcionando un ambiente antioxidante favorable en condiciones de estrés. En resumen, dada la importancia de la enzima GR en el remplazo de GSH a partir de GSSG, los resultados obtenidos podrían indicar un rol activo de esta molécula en la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), el cual estaría favorecido en las abejas que recibieron una dieta suplementada con Cum.

La enzima AChE presenta un rol importante en las sinapsis colinérgicas y en las uniones neuromusculares tanto de los invertebrados como de los vertebrados, al regular el nivel del neurotransmisor acetilcolina (Toutant et al., 1988; Kim et al., 2017). La AChE es también el sitio blanco de organofosforados e insecticidas carbamatos (Samson-Robert et al., 2015). Los resultados mostraron que la suplementación con Cum o IAA en la dieta no causó diferencias significativas en la actividad de la AChE con respecto a las abejas control. Tampoco se observaron cambios con respecto a la exposición al *tau*-fluvalinato. Estos resultados deberse a que el *tau*-fluvalinato es un acaricida piretroide. En este sentido, se ha informado una mayor actividad de AChE en estudios de campo y laboratorio de abejas expuestas a insecticidas organofosforados (Badiou et al., 2008; Boily et al., 2013).

En conjunto, los cambios enzimáticos relacionados con los mecanismos de detoxificación observados en las abejas que fueron alimentadas con Cum y con IAA podrían ser los responsables de la mayor supervivencia observada contra *tau*-fluvalinato en comparación con aquellas que recibieron una dieta de control.

Finalmente, los resultados presentados en este estudio, junto con estudios previos, demuestran la importancia evidente de los fitoquímicos dietéticos en la regulación de la detoxificación y plantea interrogantes sobre las prácticas de apicultura que implican el reemplazo de alimentos naturales (miel, polen) por sustitutos artificiales.

5 Consideraciones Finales

La abeja melífera se encuentra en una situación crítica ya que, en los últimos años, se han reportado importantes pérdidas de colmenas en distintas regiones del mundo. Esto impacta en el frágil equilibrio en la relación plantas-abejas (Maggi et al., 2016). Entre las causas del declinamiento de colonias de *A. mellifera* se incluyen la pérdida y fragmentación de hábitats, la agricultura intensiva, los monocultivos y las parasitosis. Dentro de esta última, *V. destructor* es el que produce las principales pérdidas y daños en las colmenas. A pesar de los años transcurridos desde su primer registro en *A. mellifera* y de la investigación exhaustiva en torno a su biología y control, aún no es posible lograr un manejo adecuado de sus poblaciones. Por lo tanto, es necesario comprender que la situación planteada necesita de propuestas integrales para su resolución.

En la presente Tesis Doctoral se abordó la problemática generada por *V. destructor*, considerando dos grandes cuestiones: I) su resistencia a acaricidas de síntesis y los posibles mecanismos que le dan origen; y II) el efecto de moléculas de origen vegetal como estrategia de mitigación de los daños colaterales ocasionados en *A. mellifera*, por los acaricidas de sintéticos.

Luego del análisis de los resultados, se resumen los siguientes aportes:

- 1) Se logró identificar un nuevo foco de resistencia a la flumetrina en una población de ácaros de Uruguay. No se detectó resistencia cruzada con *tau*-fluvalinato.
- 2) No se observó reversión de la resistencia al cumafós, en una población de ácaros que por 7 años no había sido expuesta a dicho acaricida. El estudio de toxicidad del cumafós en colonias de abejas no tratadas con este acaricida, durante el periodo mencionado, constituye el primer el primer registro de un estudio de dinámica de resistencia/susceptibilidad a dicho organofosforado, en una población de *V. destructor*, a lo largo del tiempo.

- 3) A través del desarrollo de protocolos específicos, se examinó un fragmento de la secuencia nucleotídica del gen VCSG en ácaros individuales, pertenecientes a distintas poblaciones de Argentina y Uruguay. Los ácaros de las poblaciones resistentes a flumetrina fueron portadores de la mutación L925V (González-Cabrera, et al. 2013). La técnica desarrollada permite la detección temprana de focos de resistencia, por lo que se podrá acceder a respuestas rápidas acerca del estado de los mismos en diferentes poblaciones de ácaros, y adecuar planes sanitarios en relación a la información obtenida.
- 4) A través de estudios de PCR cuantitativa en tiempo real, se determinó el patrón de expresión génica de GST y AChE en ácaros expuestos a concentraciones crecientes de cumafós, dando los primeros pasos para comprender las bases moleculares de su resistencia en *V. destructor*.
- 5) La suplementación de la dieta con fitomoléculas, como ácido indolacético (IAA) y ácido p- cumárico (Cum), aumentó la supervivencia de abejas nodrizas expuestas a *tau*-fluvalinato. El ácido giberélico (Ga3) no tuvo efectos sobre la supervivencia de abejas expuestas a dicho acaricida.
- 6) La suplementación con IAA y Cum en la dieta de abejas nodrizas, causa cambios significativos en la actividad de enzimas de detoxificación. Los cambios enzimáticos relacionados con los mecanismos de detoxificación observados en las abejas que fueron alimentadas con Cum y con IAA, podrían ser los responsables de la mayor supervivencia observada frente a la exposición al *tau*-fluvalinato. A partir de estos estudios, se abre una interesante línea de investigación acerca del efecto de estas y otras fitomoléculas, sobre la supervivencia de colonias de abejas expuestas a otros acaricidas de síntesis, con distintos mecanismos de acción (cumafós, amitraz).

Teniendo en cuenta estos resultados, debe dirigirse especial atención a la interpretación de las dinámicas poblacionales de *V. destructor* en la región. La aparición

de nuevos focos de resistencia a los acaricidas de síntesis, sumado a la falta de reversión de la resistencia demostrada para el cumafós, dejan en claro una vez más, la complejidad de la problemática y la necesidad de contar con estrategias y herramientas que permitan adelantarse en la toma de decisiones respecto al manejo del apiario. A su vez, es fundamental poder interpretar las expresiones del sistema parasitario a diferentes escalas regionales que tengan en cuenta los aspectos biológicos y ecológicos del parásito y del hospedador para poder implementar un Manejo Integrado de Plagas.

Por otra parte, del presente trabajo también surgen resultados prometedores en cuanto al desarrollo de un producto a base de fitoquímicos, con el fin de mejorar la performance de las colonias de *A. mellifera* frente a posibles estresores a los que habitualmente se encuentran expuestas, como son los acaricidas de síntesis. Se debería continuar con el estudio de dichas fitomoléculas, analizando su impacto en relación a otros plaguicidas que puedan estar presentes en las colmenas y en contacto con la abeja melífera, así como su interacción con otros estresores.

Apéndice 1

Protocolo de Extracción de ADN a partir de 1 ácaro Varroa destructor con Kit Roche

Descripción:

1. Eliminar por completo el alcohol de los ácaros por evaporación.
2. Colocar los ácaros individuales con 200 µl de Tissue Lysis buffer en un tubo estéril de 1,5 ml.
3. Agregar 40 µl de proteinasa K (provista por el kit), mezclar bien.
4. Incubar *over night* a 55 °C (en el Termoblock)
5. Agregar 200 µl de BINDING BUFFER (provisto por el kit Roche)
6. Incubar 10 min a 70 °C (en el Termoblock)
7. Agregar 100 µl de isopropanol, mezclar bien y transferir la mezcla a la columna.
8. Centrifugar 1 min a 8.000g a temperatura ambiente. Descartar el filtrado y colocar la columna nuevamente en el tubo de 2 ml.
9. Colocar 500 µl de Buffer Inhibitor Removal
10. Centrifugar 1 min a 8.000g a temperatura ambiente. Descartar el filtrado y colocar la columna nuevamente en el tubo de 2 ml.
11. Colocar 500 µl de Wash Buffer
12. Centrifugar 1 min a 8.000g a temperatura ambiente. Descartar el filtrado y colocar la columna nuevamente en el tubo de 2 ml.
13. Colocar 500 µl de Wash Buffer
14. Centrifugar 1 min a 8.000g a temperatura ambiente. Descartar el filtrado y colocar la columna nuevamente en el tubo de 2 ml.
15. Centrifugar a 13000 g durante 10 seg.
16. Colocar la columna en un tubo de 1,5 ml limpio (provisto) y descartar el tubo de 2 ml con el filtrado.
17. Agregar 30 µl del Elution Buffer TE (previamente precalentado a 70°C para mejorar la eficiencia de elución) en el centro de la membrana, incubar a temperatura ambiente 1 min.
18. Centrifugar a 8.000g durante 1 min.

Conservar el ADN a -20 °C

Apéndice 2

Pasos seguidos para el diseño de los cebadores

Descripción:

- 1) Se buscó la secuencia de ADNc y ADN genómico correspondiente al gen de interés de *V. destructor* en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- 2) Se efectuó un análisis de BLAST (*Basic Local Alignment Tool*, (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) con la secuencia completa del ADNc del gen de interés con el fin de determinar en qué posiciones se encuentran los sitios de unión exón-exón en este gen.
- 3) Se ingresó la secuencia completa del ADNc de cada gen en el programa de diseño de cebadores Premier (PREMIER Biosoft International) y se efectuaron búsquedas de cebadores, restringiendo el tamaño del producto esperado de PCR entre 70 y 200 pb.
- 4) Los cebadores de mayor puntaje según el programa fueron sometidos a *In Silico* PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) contra el genoma del *V. destructor*. Esto se realizó con el fin de determinar si los cebadores amplificaban específicamente el transcripto correspondiente al gen de interés. Todos aquellos cebadores que presentaban amplificados inespecíficos fueron eliminados.
- 5) Los amplicones generados por los diferentes cebadores seleccionados se analizaron haciendo un análisis de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la secuencia del amplicón (generado a partir del ADNc) contra el genoma de *V. destructor*, de manera de conocer de qué tamaño es el amplicón que van a generar los cebadores en caso de tener como templado ADN genómico contaminante en nuestros ensayos de expresión.

6) Una vez analizada la especificidad *In Silico* de los cebadores se procedió a analizar las características termodinámicas de los diferentes pares mediante dos programas: The Oligo Analyzer (<http://scitools.idtADN.com/scitools/Applications/OligoAnalyzer/>) y NetCebador (<http://www.premierbiosoft.com/netcebador/netprlaunch/netprlaunch.html>)

Se realizó la cuantificación de los niveles de mRNA de AChE y GST en ácaros *V. destructor* expuestos a cumafós. La eficiencia de amplificación fue determinada para cada gen usando diluciones (10-veces) del ADNc. En todos los ensayos, la curva estándar para cada gen tuvo una pendiente de entre -3.2 y -3.5 y el desvío estándar entre duplicados, fue en todos los casos < 0.167 , como se recomienda para qPCR (Bustin, 2002).

Apéndice 3

Puesta a punto de las reacciones de PCR en Tiempo Real para los genes de estudio

Se muestran los pasos seguidos en la optimización de los ensayos para detectar y cuantificar los niveles de expresión de ARNm de los genes acetilcolinesterasa (AChE) y glutatión-S transferasa (GST). Se diseñaron y analizaron secuencias de cebadores específicos para el ARNm de los diferentes genes. Una vez sintetizados, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real para verificar si estos oligonucleótidos podían ser utilizados para la reacción de los ensayos de expresión génica. Se utilizó como molde el ADNc obtenido a partir de la retrotranscripción de 1,5 µg de ARN total de proveniente de grupos de 11 ácaros. Posteriormente, se realizó el análisis de especificidad del producto generado mediante el uso del protocolo de disociación del fragmento de doble cadena. Como resultado de esta evaluación, se determinó la presencia de un único pico, indicando la presencia de un producto único de ADN doble cadena, que corresponde al producto resultante del ensayo de amplificación de cada marcador con los cebadores específicos.

Para determinar el rango dinámico de amplificación del ARNm de los diferentes marcadores se realizaron diluciones seriadas de una reacción de retrotranscripción de 20 µl de volumen final donde se utilizó 1 µg de ARN total de abeja control de como molde. Si consideramos la eficiencia de la retrotranscriptasa reversa como un 100%, tendríamos una concentración de ADNc de 50 ng/µl.

Como resultado de este análisis, se determinó que la pendiente de la recta para todos los marcadores estudiados se aproxima al valor teórico esperado de -3,33. Del conjunto de estos resultados se observa que los protocolos de cuantificación por PCR en tiempo real implementados para la detección de los transcritos de AChE y GST son reproducibles, dado que presentan un desvío estándar menor a 0,12 y sensibles, ya que

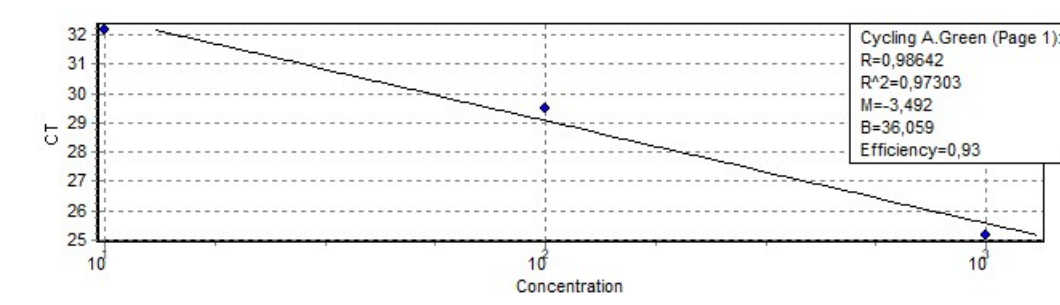
permiten detectar el transcripto en una dilución de hasta 1.000 veces de la retrotranscripción de 1,5 µg de ARN total.

A continuación (Figuras 27 y 28) se muestran en detalle los pasos seguidos en la puesta a punto de las PCRs en tiempo Real para la detección de los diferentes transcriptos de interés, para cada gen se muestra una figura con dos paneles (A y B):

A. Representación gráfica de los valores de Ct (número de ciclo) versus el logaritmo de la concentración inicial (Log CO) del ADNc molde. A la derecha se puede observar el valor de la pendiente, la cual nos permite conocer la eficiencia de la reacción (Ver Introducción).

B. Curva de disociación para la verificación de la amplificación específica del transcripto de interés. Se representa en el eje de las ordenadas la tasa de cambio de las unidades relativas de fluorescencias (URF) con el tiempo (T) ($-d(URF)/dT$) versus la temperatura (°C) en el eje de las abscisas. Esta tasa se marca como un pico a la temperatura específica de disociación.

A)



B)

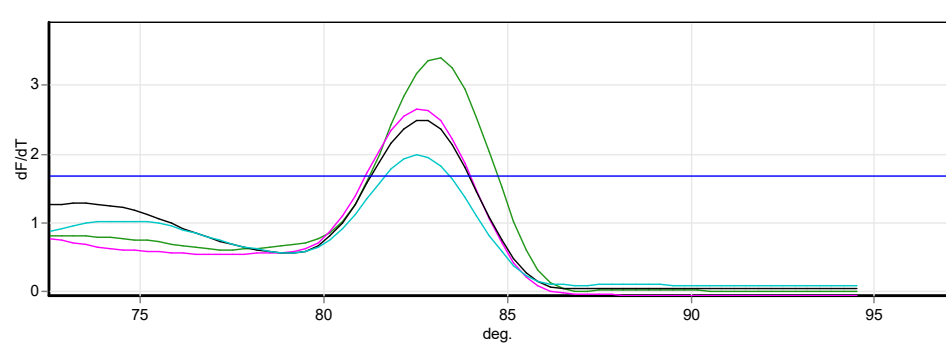
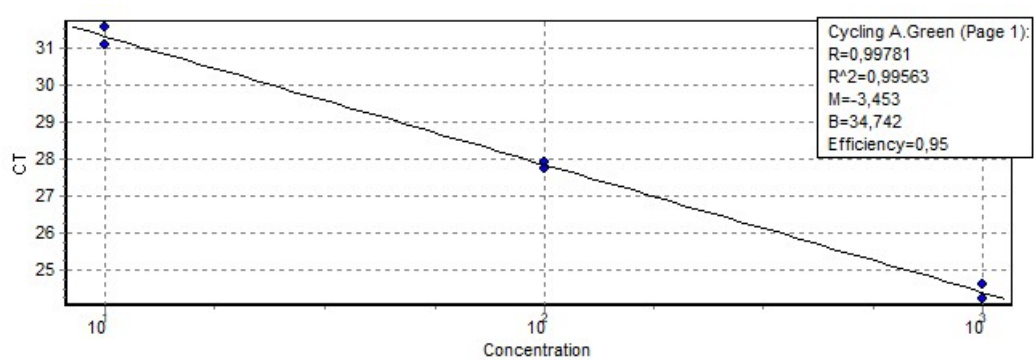


Figura 27. Optimización del ensayo de PCR en Tiempo Real del gen AChE de *Varroa destructor*

A)



B)

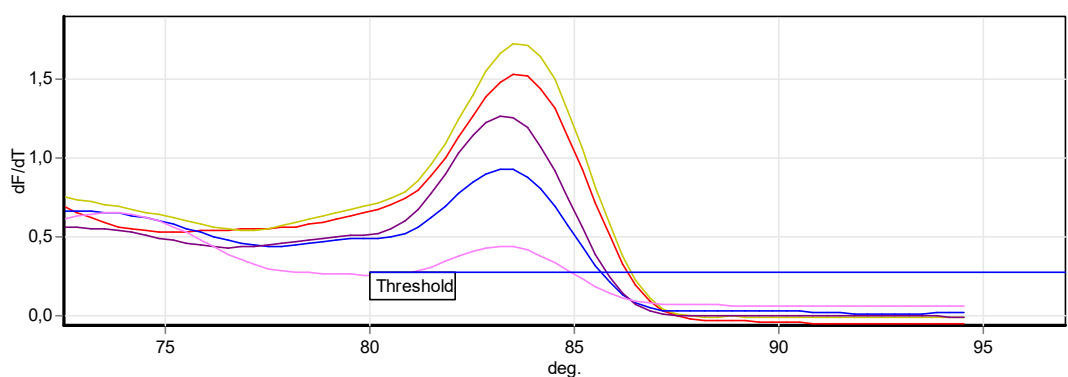


Figura 28. Optimización del ensayo de PCR en Tiempo Real del gen GST de *Varroa destructor*

Apéndice 4

Puesta a punto de las reacciones de PCR en Tiempo Real para los genes de estudio

Se muestran los pasos seguidos en la optimización de los ensayos para detectar y cuantificar los niveles de expresión de ARNm de citocromo P450 9Q3 (CYP9Q3), citocromo P450 6AS4 (CYP6AS4) y Carboxilesterasa (CRBXase). Se diseñaron y analizaron secuencias de cebadores específicos para el ARNm de los diferentes genes. Una vez sintetizados, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real para verificar si estos oligonucleótidos podían ser utilizados para la reacción de los ensayos de expresión génica. Se utilizó como molde el ADNc obtenido a partir de la retrotranscripción de 1,5 µg de ARN total de abeja control alimentada con dieta de jarabe de azúcar 2:1. Posteriormente, se realizó el análisis de especificidad del producto generado mediante el uso del protocolo de disociación del fragmento de doble cadena. Como resultado de esta evaluación, se determinó la presencia de un único pico, indicando la presencia de un producto único de ADN doble cadena, que corresponde al producto resultante del ensayo de amplificación de cada marcador con los cebadores específicos.

Para determinar el rango dinámico de amplificación del ARNm de los diferentes marcadores se realizaron diluciones seriadas de una reacción de retrotranscripción de 20 µl de volumen final donde se utilizó 1 µg de ARN total de abeja control de como molde. Si consideramos la eficiencia de la retrotranscriptasa reversa como un 100%, tendríamos una concentración de ADNc de 50 ng/µl.

Como resultado de este análisis, se determinó que la pendiente de la recta para todos los marcadores estudiados se aproxima al valor teórico esperado de -3,33. Del conjunto de estos resultados se observa que los protocolos de cuantificación por PCR en tiempo real implementados para la detección de los transcritos de CYP9Q3, CYP6AS4 y CRBXase son reproducibles, dado que presentan un desvío estándar menor a 0,12 y

sensibles, ya que permiten detectar el transcripto en una dilución de hasta 1.000 veces de la retrotranscripción de 1,5 µg de ARN total.

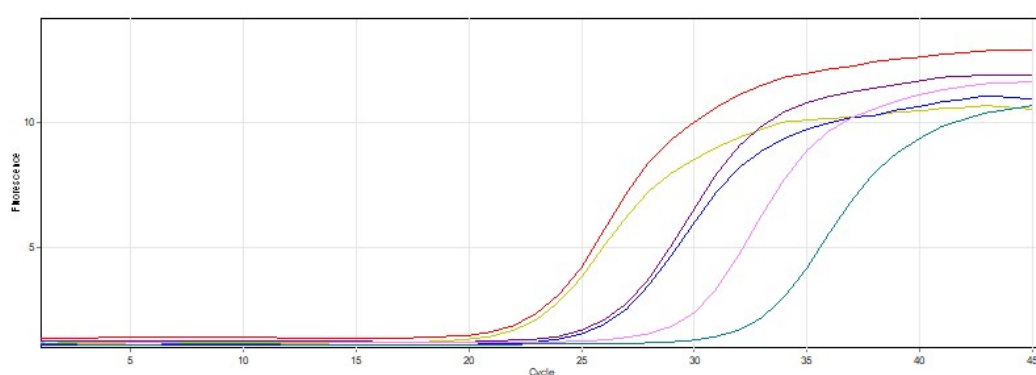
A continuación (Figuras 29, 30 y 31) se muestran en detalle los pasos seguidos en la puesta a punto de las PCRs en tiempo Real para la detección de los diferentes transcriptos de interés, para cada gen se muestra una figura con tres paneles (A, B y C):

A. Registro de una curva de rango dinámico en una puesta a punto del ensayo de PCR en tiempo real. Protocolo empleando como molde diluciones seriadas de ADNc de abeja control alimentada con una dieta de jarabe de azúcar 2:1 (2 µg – 200 ng – 20 ng – 2 ng) generado mediante la retrotranscripción de 1,5 µg de ARN total. El registro se presenta en el formato de un gráfico de aumento de fluorescencia graficada en función del número de ciclos.

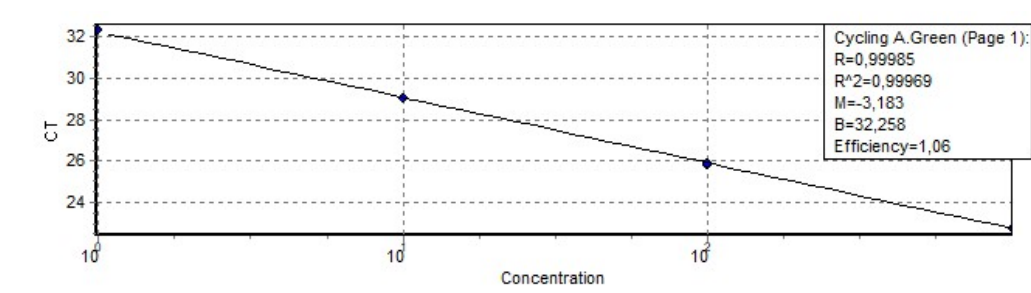
B. Representación gráfica de los valores de Ct (número de ciclo) versus el logaritmo de la concentración inicial (Log CO) del ADNc molde. A la derecha se puede observar el valor de la pendiente, la cual nos permite conocer la eficiencia de la reacción (Ver Introducción).

C. Curva de disociación para la verificación de la amplificación específica del transcripto de interés. Se representa en el eje de las ordenadas la tasa de cambio de las unidades relativas de fluorescencias (URF) con el tiempo (T) ($-d(URF)/dT$) versus la temperatura (°C) en el eje de las abscisas. Esta tasa se marca como un pico a la temperatura específica de disociación.

A)



B)



C)

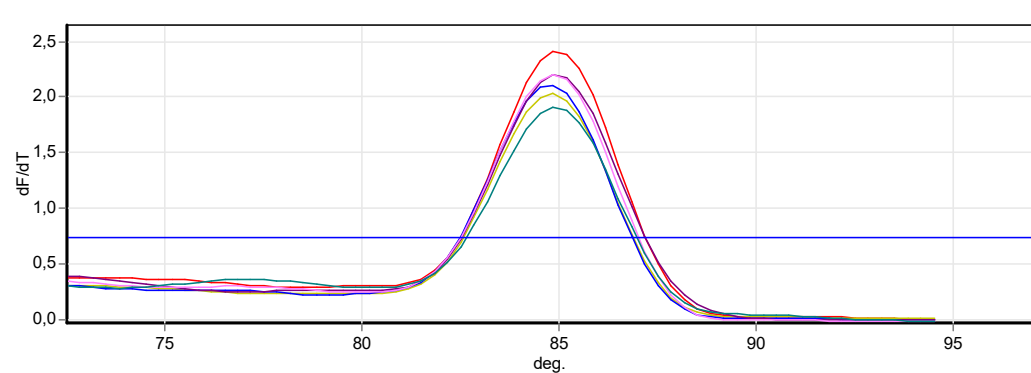
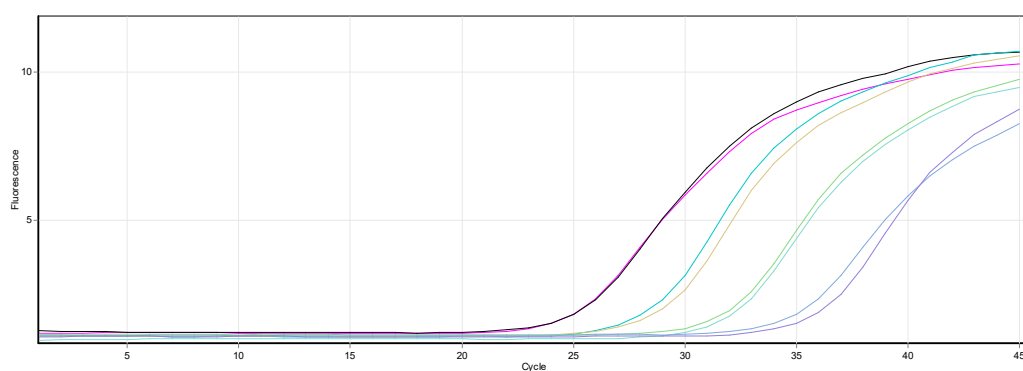
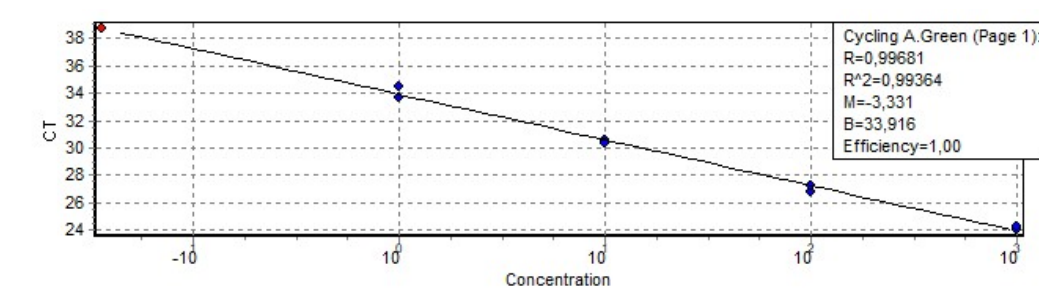


Figura 29. Optimización del ensayo de PCR en Tiempo Real del gen CYP9Q3

A)



B)



C)

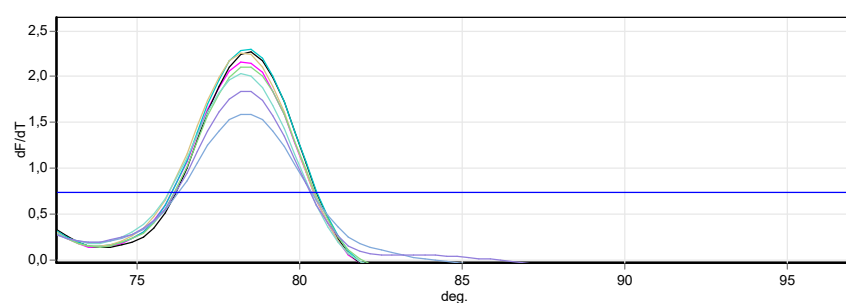
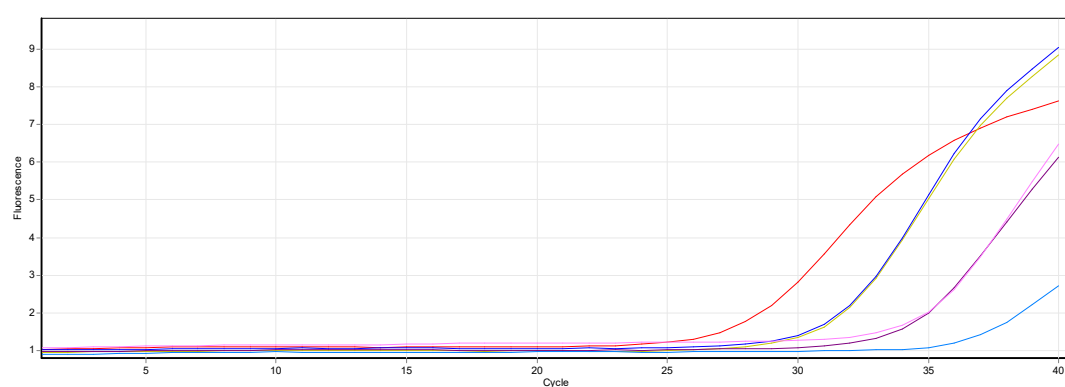
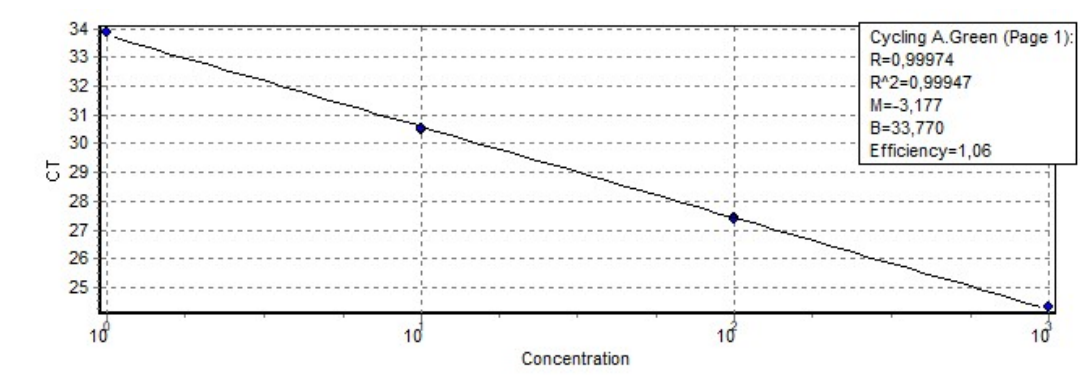


Figura 30. Optimización del ensayo de PCR en Tiempo Real del gen CYP6AS4

A



B)



C)

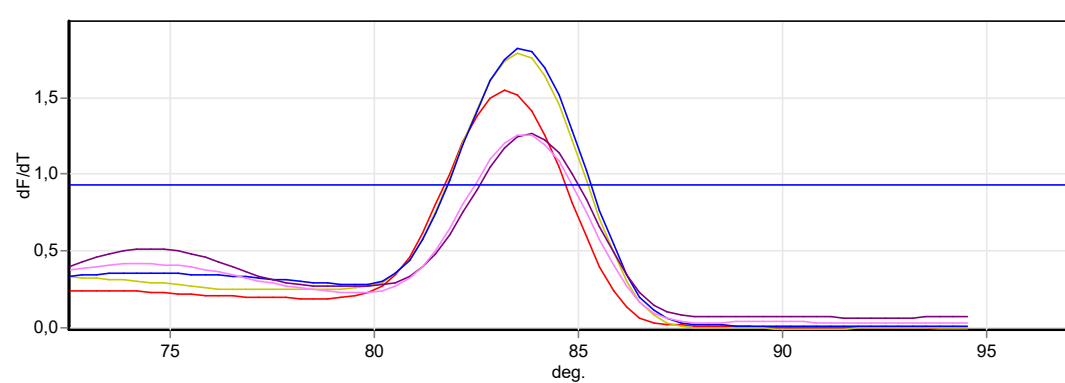


Figura 31. Optimización del ensayo de PCR en Tiempo Real del gen CRBXase.

6 Referencias bibliográficas

- Abbott, W. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol*, 18: 11-16.
- Ahn S.J., Vogel H., Heckel D.G. (2012). Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. *Insect Biochem Mol Biol*, 42:133-147.
- Akimov I., Yastrebtsov A., Gorgol V. (1988). Functional and morphological specialization of *Varroa jacobsoni* for parasitism. Africanized honey bees and bee mites. Needham (Ed.) Cheshire, Ellis Horwood Ltd.
- Alippi A., Albo G., Marcángeli J., Leniz D., Noriega A. (1995). The mite *Varroa jacobsoni* does not transmit American Foulbrood from infected to healthy colonies. *Exp App Acarol*, 19: 607-613.
- Alissandrakis E., Ilias A., Tsagkarakou A. (2017). Pyrethroid target site resistance in Greek populations of the honey bee parasite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *J Apic Res*, 56: 625–630.
- Allen M.F., Ball B.V., White R.F., Antoniw J.F. (1986). The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. *J Apicult Res*, 25: 100–105.
- Alout H., Berthomieu A., Hadjivassilis A., Weill M., (2007). A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochem Mol Biol*, 37, 41-47.
- Amdam G., Hartfelder K., Norberg K., Hagen A., Omholt S. (2004). Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *J Econ Entomol*, 97: 741-747.
- Anderson D.L., East I.J. (2008). The latest buzz about colony collapse disorder. *Science* 319 (5864), 724–725.
- Anderson D.L., Trueman J.W.H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari : Varroidae) is more than one species. *Exp Appl Acarol*, 24(3): 165-189.
- Atkins E.L. (1992). Poisoning of honey bees. In Graham, J M (ed) *The hive and the honey bee*. Dadant & Sons Inc.; Hamilton, IL, 153–1208.

- Avni D., Dag A., Shafir S. (2009). The effect of surface area of pollen patties fed to honey bee (*Apis mellifera*) colonies on their consumption, brood production and honey yields. *J Apic Res*, 48: 23-28.
- Badiou A., Meled M., Belzunces L.P. (2008). Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase a biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*, 69: 246-253.
- Bailey L., Carpenter J., Govier D., Woods R. (1980). Bee virus Y. *J Gen Virol*, 51: 405-407.
- Bailey L., Ball B.V. (1991). *Honey Bee Pathology* (2nd ed.). Academic Press, London.
- Ball B. (1985). Acute paralysis virus isolates from honey bee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *J Apic Res*, 24: 115-119.
- Ball B. (1988). The impact of secondary infections in honeybee colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. En: *Africanized Bees and Bee Mites*. Ed. Needham, Cheshire, Ellis Horwood Ltd.
- Ball B. (1989). *Varroa jacobsoni* as a virus vector. Presents Status of Varroatosis and Progress in the *Varroa* Control. Ed. R. Cavalloro.
- Ball B., Allen M. (1988). The prevalence of pathogens in honey bee colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann App Biol*, 113: 237-244.
- Berenbaum M.R., Johnson R.M. (2015). Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Curr Opin Insect Sci*, 10: 51-58.
- Bogdanov S., Imdorf A., Kilchenmann V. (1998). Residues in wax and honey after Apilife VAR® treatment. *Apidologie*, 29(6): 513-524.
- Boily M., Sarrasin B., DeBlois C., Aras P., Chagnon M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: Laboratory and field experiments. *Environ Sci Pollut Res*, 20: 5603-5614.
- Boot W., Calis J., Beetsma J. (1991). Invasion of Varroa mites into honeybee brood cells; when do brood cells attract varroa mites? *Proc Exp Appl Entomol*, 2: 154-156.
- Boot W., Schoenmaker J., Calis J., Beetsma J. (1995). Invasion of *Varroa jacobsoni* into drone brood cells of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 26: 109-118.
- Bowen-Walker P.L., Martin S.J., Gunn A. (1999). The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera*) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J Invertebr Pathol*, 73: 101-106.

- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Brodschneider R., Haidmayer C., Riessberger-Gallé U., Crailsheim K. (2009). Protein uptake in honeybee colonies supplemented with two protein diets simultaneously. *Apidologie*, 40: 662.
- Brodschneider R., Crailsheim K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278-294.
- Brodschneider R., Moosbeckhofer R., Crailsheim K. (2010). Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two-year case study in Austria and South Tyrol. *J Apic Res*, 49: 23-30.
- Burgerjon A. (1956). An improved laboratory apparatus for applying direct sprays and surface films, with data on the electrostatic charge on atomized fluids. *Annals of Applied Biology*, 39: 1-28.
- Burley L.M., Fell R.D., Saacke R.G. (2008). Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides. *J Econ Entomol*, 101: 1081-1087.
- Bustin S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR), trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29: 23-39.
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol*, 34: 597-601.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. (2009). The MIQE Guidelines, Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*, 55: 611-622.
- Campana B.J., Moeller F.E. (1977). Honey bees: preference for and nutritive value of pollen from five plant sources. *J Econ Entomol*, 70: 39-41.
- Campbell E.M., McIntosh C.H., Bowman A.S. (2016). A Toolbox for Quantitative Gene Expression in *Varroa destructor*: RNA Degradation in Field Samples and Systematic Analysis of Reference Gene Stability. *PLoS One*, 11(5): e0155640.
- Carvalho S.M., Belzunces L.P., Carvalho G.A., Brunet J.-L., Badiou-Beneteau A. (2013). Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a study of

- exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. Environ Toxicol Chem, 17: 2114-2214.
- Catterall W.A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron, 26: 13–25.
- Chauret N., Tremblay N., Lackman R.L., Gauthier J.Y., Silva J.M., Marois J., Yergey J.A., Nicoll-Griffith D.A. (1999). Description of a 96-well plate assay to measure cytochrome P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. Anal Biochem, 276: 215-226.
- Chauzat M.P., Carpentier P., Martel A.C., Bougeard S., Cougoule N., Porta P., Lachaize J., Madec F., Aubert M., Faucon J.P. (2009). Influence of pesticide residues on honey Bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. Environ Entomol, 38(1): 514- 523.
- Chen Y.P., Siede R. (2007). Honey bee viruses. Adv Virus Res, 70: 33–80.
- Claudianos C., Ranson H., Johnson R.M., Biswas S., Schuler M.A., Berenbaum M.R., Feyereisen R., Oakeshott J.G. (2006). A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. Insect Mol Biol, 15: 615-636.
- Collins, A.M., Pettis, J.S., Wilbanks, R., Feldlaufer, M.F., 2004. Performance of honey bee (*Apis mellifera*) queens reared in beeswax cells impregnated with coumaphos. J. Apic. Res. 43, 128–134.
- Correa-Marques M.H., de Jong D. (1998). Uncapping of worker bee brood, a component of the hygienic behavior of Africanized honey bees against the mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. Apidologie, 29: 283–289.
- Correa-Marques M.H., de Jong D., Rosenkranz P., Goncalves L.S. (2002). *Varroa*-tolerant Italian honey bees introduced from Brazil were not more efficient in defending themselves against the mite *Varroa destructor* than Carniolan bees in Germany. Genet Mol Res, 1: 153–158.
- Correa-Marques M.H., Medina L.M., Martin S.J., de Jong D. (2003). Comparing data on the reproduction of *Varroa destructor*. Genet Mol Res, 2: 1–6.
- Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P.L., Briese T., Hornig M., Geiser D.M., Martinson V., vanEngelsdorp D., Kalkstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J.H., Cui L.W., Hutchison S.K., Simons J.F., Egholm M., Pettis J.S., Lipkin W.I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science, 318(5848): 283–287.

- Crailsheim K. (1991). Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. J Comp Physiol, 161(1): 55-60.
- Crailsheim K. (1998). Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). Apidologie, 29: 97-112.
- Cremonez T.M., de Jong D., Bitondi M.M.G. (1998). Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). J Econ Entomol, 91: 1284-1289.
- Currie R.W., Gatién P. (2006). Timing acaricide treatments to prevent *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) from causing economic damage to honey bee colonies. Can Entomol, 138(2): 238-252.
- da Silva Vaz J.I., Imamura S., Ohashi K., Onuma M. (2004). Cloning, expression and partial characterization of a *Haemaphysalis longicornis* and a *Rhipicephalus appendiculatus* glutathione S-transferase. Insect Mol Biol, 13(3): 329-335.
- Daly H., De Jong D., Stone N. (1988). Effect of parasitism by *Varroa jacobsoni* on morphometrics of Africanized worker honeybees. J Apic Res, 27: 126-130.
- Damiani N., Gende L., Bailac P., Marcangeli J., Eguaras M. (2009). Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Parasitol Res, 106(1): 145-152.
- Davies T.G.E., Field L.M., Usherwood P.N.R., Williamson M.S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. IUBMB Life, 59: 151–162.
- De Groot A.P. (1953). Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.). Physiol Comp Oecol, 3: 197-285.
- de Jong D. (1981). Effect of queen cell construction on the rate of invasion of honeybee brood cells by *Varroa Jacobsoni*. Journal of Apicultural Research, 20(4): 254-257.
- de Jong D., De Andrea Roma D., Gonçalves L.S. (1982a). A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honeybees. Apidologie, 13(3): 297-306.
- de Jong D., de Jong P., Goncalves L. (1982b). Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. J Apic Res, 21: 165-167.
- de Jong D., Gonçalves L.S., Morse R.A. (1984). Dependence on climate of the virulence of *Varroa jacobsoni*. Bee World, 65:117–121.

- De Rycke P.H., Joubert J.J., Hossein Hosseinian S., Jacobs F.J. (2002). The possible role of *Varroa destructor* in the spreading of American foulbrood among apiaries. *Exp Appl Acarol*, 27(4): 313-318.
- DeGrandi-Hoffman G., Wardell G., Ahumada-Secura F., Rinderer T.E., Danka R., Pettis J. (2008). Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *J Apic Res*, 47(4): 265-270.
- Delaplane K.S., Hood W.M. (1999). Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud. In the southeastern USA. *Apidologie*, 30(5): 383-395.
- Delaplane K., Mayer D. (2000). Crop polination by bees. CABI Publishing.
- Dermauw W., Van Leeuwen T. (2014). The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem Mol Biol*, 45: 89-110.
- Devine G. (2003). Insecticide and acaricide resistance. *Arab J of Plant Protect*, 21(2): 175-180.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. (2017). InfoStat version 2017. Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Recuperado de <http://www.infostat.com.ar>.
- Dietz A., Stevenson H.R. (1980). Influence of long-term storage on the nutritional value of frozen pollen for brood rearing of honey bees. *Apidologie*, 11: 143-151.
- Doner L.W. (1977). The sugars of honey - a review. *J Sci Food Agric*, 28(5): 443-456.
- Dong K., Du Y., Rinkevich F., Nomura Y., Xu P., Wang L., Silver K., Zhorov B.S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect. Biochem Mol Biol*, 50: 1-17.
- Donzé G., Guérin P.M. (1994). Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honey bee brood. *Behav Ecol Sociobiol*, 34: 305-319.
- Donzé G., Hermann M., Bachofen B., Guerin M. (1996). Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Ecol Entomol*, 21: 17-26.
- Duay P., de Jong D., Engels W. (2002). Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genet Mol Res* 1: 227-232.
- Duay P., de Jong D., Engels W. (2003). Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*)

- multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, 34: 61-65.
- Eguaras M.J., Ruffinengo S.R. (2006). Estrategias para el control de *Varroa*. Editorial Martin. Mar del Plata.
- Eguaras M., Marcangeli J., Oppedisano M., Fernández N. (1995). Mortality and reproduction of *Varroa jacobsoni* in resistant honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Argentina. *Bee Science*, 3: 174-178.
- Eguaras M.J., Labattaglia M., Faverin C., Hoyo M., Palacio A., Ruffinengo S., Bedascarrasbure E. (2001). *Varroa jacobsoni* control with formic acid used in different application ways in subtropical and temperate climates. *Apiacta*, 36: 97-101.
- Eguaras M.J., Fuselli S., Gende L., Fritz R., Ruffinengo S.R., Clemente G., González A., Bailac P.N., Ponzi M.I. (2005). An *in vitro* evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. *J Essent Oil Res*, 17(3): 336-340.
- Ellis A.M., Hayes Jr G.W. (2009). An evaluation of fresh versus fermented diets for honey bees (*Apis mellifera*). *J Apic Res*, 48(3): 215-216.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-90.
- Elzen P., Eischen F., Baxter J., Pettis J., Elzen G., Wilson W. (1998). Fluvalinate resistance in *Varroa jacobsoni* from several geographic locations. *Am Bee J*, 138: 674-676.
- Elzen P.J., Eischen F.A., Baxter J.R., Elzen G.W., Wilson W.T. (1999). Detection of resistance in US *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata: Varroidae) to the acaricide fluvalinate. *Apidologie*, 30: 13–17.
- Elzen P., Baxter J., Spivak M., Wilson W. (2000). Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie*, 31: 437–441.
- Elzen P., Westervelt D. (2002). Detection of coumaphos resistance in *Varroa destructor* in Florida. *Am Bee J*, 142: 291–292.
- Elzen P., Westervelt D. (2004). A scientific note on reversion of fluvalinate resistance to a degree of susceptibility in *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35, 519-520.
- Enayati A.A., Ranson H., Hemingway J. (2005). Insect glutathione transferases and

- insecticide resistance. *Insect Molec Biol*, 14: 3-8.
- Errea E., Licandro H. (2009). Apicultura: Situación actual y perspectivas. *Opypa oficina de programación y política agropecuaria – ministerio de ganadería agricultura y pesca*. 113–118.
- Feazel-Orr H.K., Catalfamo K.M., Brewster C.C., Fell R.D., Anderson T.D., Traver B.E. (2016). Effects of pesticide treatments on nutrient levels in worker honey bees (*Apis mellifera*). *Insects*, 7: 8.
- Fernández N., Eguaras M., Hernández D. (1993). Distribution patterns of *Varroa jacobsoni* Oud. on *Apis mellifera* L during winter in Argentina. *Apidologie*, 24: 397–401.
- Feyereisen R. (2005). Insect cytochrome P450. *Compr Mol Insect Sci*, 4: 1-77.
- Flamini G. (2003). Acaricides of natural origin, personal experiences and review of literature (1990-2001). *Stud Nat Prod Chem*, 28(1): 381-451.
- Floris I., Cabras P., Garau V., Minelli E., Satta A., Troullier J. (2001). Persistence and effectiveness of pyrethroids in plastic strips against *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and mite resistance in a Mediterranean area. *J Econ Entomol*, 94(4): 806–810.
- Free J.B. (1987). *Pheromones of Social Bees*. Chapman and Hall, London, UK, 29-68.
- Frost E.H., Shutler D., Hillier N.K. (2013). Effects of fluvalinate on honey bee learning, memory, responsiveness to sucrose, and survival. *J Exp Biol*, 216: 2931–2938.
- Fuchs S. (1992). Choice in *Varroa jacobsoni* Oud. between honey bee drone or worker brood cells for reproduction. *Behav Ecol Sociobiol*, 31:429–435.
- Gallagher E.P., Canadá A.T., Di Giulio R.T. (1992). The protective role of glutathione in chlorothanil induced toxicity to channel catfish. *Aquat Toxicol*, 23: 155-168.
- Garrido C., Rosenkranz P., Stürmer M., Rübsam R., Büning J. (2000). Toluidine blue staining as a rapid measure for initiation of oocyte growth and fertility in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 31: 559–566.
- Garrido C, Rosenkranz P (2003). The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*. *Exp Appl Acarol*, 31: 269–273.
- Gashout H.A., Goodwin P.H., Guzman-Novoa E. (2018). Lethality of synthetic and natural acaricides to worker honey bees (*Apis mellifera*) and their impact on the expression of health and detoxification-related genes. *Environ Sci and Pollut R*, 25(34): 34730-34739.

- Genersch E. (2010). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87: 87-97
- Georghiou G.P., Taylor C.E. (1986). Factors influencing the evolution of resistance. *Pesticide resistance: strategies and tactics for management*, Sisler (Eds.), Washington, DC: National Academy Press, 157–169.
- González-Cabrera J., Davies T.G.E., Field L.M., Kennedy P.J., Williamson M.S. (2013). An Amino Acid Substitution (L925V) Associated with Resistance to Pyrethroids in *Varroa destructor*. *PLoS One*, 8: e82941.
- González-Cabrera J., Rodríguez-Vargas S., Davies T.G.E., Field L.M., Schmehl D., Ellis J.D., Krieger K., Williamson M.S. (2016). Novel Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel of Pyrethroid-Resistant *Varroa destructor* populations from the Southeastern USA. *PLoS One*, 11: e0155332.
- González-Cabrera J., Bumann H., Rodríguez-Vargas S., Kennedy P.J., Krieger K., Altreuther G., Hertel A., Hertlein G., Nauen R., Williamson M.S. (2018). A single mutation is driving resistance to pyrethroids in European populations of the parasitic mite, *Varroa destructor*. *J Pest Sci*, 91(3): 1137-1144.
- Goodwin R.M., Taylor M.A., McBrydie H.M., Cox H.M. (2005). Base levels of resistance to common control compounds by a New Zealand population of *Varroa destructor*. *N Z J Crop Hortic Sci*, 33: 347–352.
- Greatti M., Milani N., Nazzi F. (1992). Reinfestation of an acaricide-treated apiary by *Varroa jacobsoni* Oud. *Exp Appl Acarol*, 16(4): 279-286.
- Guengerich F.P. (2005). Human cytochrome P450 enzymes. in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3rd ed. Ortiz de Montellano PR ed (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York), 377–530.
- Guerrero F.D., Bendele K.G., Chen A.C., Li A.Y., Miller R.J., Pleasance E., Varhol R., Rousseau M.E., Nene V.M. (2007). Serial analysis of gene expression in the southern cattle tick following acaricide treatment of larvae from organophosphate resistant and susceptible strains. *Insect Mol Biol*, 16: 49-60.
- Guzmán-Novoa E., Vandame R., Arechavaleta M.E. (1999). Susceptibility of European and Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) to *Varroa jacobsoni* Oud. in Mexico. *Apidologie*, 30: 173-182.
- Haarmann T., Spivak M., Weaver D., Weaver B., Glenn T. (2002). Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *J Econ Entomol*, 95: 28-35.

- Habig W.H., Jakoby W.B. (1981). Assays for differentiation of glutathione-S-transferases. *Methods Enzymol*, 77: 398-405.
- Hagedorn H.H., Moeller F.E. (1968). Effect of the age of pollen used in pollen supplements on their nutritive value for the honeybee. I. Effect on thoracic weight, development of hypopharyngeal glands, and brood rearing. *J Apic Res*, 7: 89-95.
- Hardy G.H. (1908). Mendelian Proportions in a mixed population. *Science*, 28(706): 49-50.
- Haydak M.H. (1970). Honey bee nutrition. *Ann Rev Entomol*, 15: 143-156.
- Herbert E.W., Shimanuki H. (1977). Brood-rearing capability of caged honeybees fed synthetic diets. *J Apic Res*, 15: 150-153.
- Herbert E.W., Shimanuki H., Caron D. (1977). Optimum protein levels required by honey bees (Hymenoptera, Apidae) to initiate and maintain brood rearing. *Apidologie*, 8: 141-146.
- Herbert E.W., Shimanuki H. (1978a). Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 9: 33-40.
- Herbert E.W., Shimanuki H. (1978b). Mineral requirements for brood-rearing by honey bees fed a synthetic diet. *J Apic Res*, 17: 118-122.
- Herbert E.W. (1980) Effect of diet on the rate of brood rearing by naturally and instrumentally inseminated queens. *Apidologie*, 11: 57-62.
- Herbert E.W., Shimanuki H., Shasha B.S. (1980). Brood rearing and food consumption by honeybee colonies fed pollen substitutes supplemented with starch encapsulated pollen extracts. *J Apic Res*, 19: 115-118.
- Herbert E.W., Shimanuki H. (1982). Effect of population density and available diet on the rate of brood rearing by honey bees offered a pollen substitute. *Apidologie*, 13: 21-28.
- Herbert E.W., Vanderslice J.T., Higgs D.J. (1985). Effect of dietary vitamin C levels on the rate of brood production of freeflying and confined colonies of honey bees. *Apidologie*, 16: 385-394.
- Herbert E.W., Sylvester H.A., Vandenberg J.D., Shimanuki H. (1988). Influence of nutritional stress and the age of adults on the morphometrics of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 19(3): 221-230.
- Higes M., Martin-Hernandez R., Botias C., Bailon E.G., González-Porto A.V., Barrios L., del Nozal M.J., Bernal J.L., Jimenez J.J., Palencia P.G., Meana A. (2008). How

- natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environ Microbiol, 10(10): 2659–2669.
- Hinton B.T., Palladino M.A., Rudolph D., Labus J.C. (1995). The epididymis as protector of maturing spermatozoa. Reprod Fertil Dev, 7: 731-745.
- Hubert J., Nesvorna M., Kamler M., Kopecky J., Tyl J., Titera D., Stara J. (2014). Point mutations in the sodium channel gene conferring tau-fluvalinate resistance in *Varroa destructor*. Pest Manag Sci, 70: 889-894.
- Ifantidis M. (1983). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honey bee brood cells. J Apic Res, 22: 200-206.
- Ifantidis M.D., Thrashyvolou A., Pappas M. (1988). Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells. Apidologie, 19: 387–396.
- Imdorf A., Bogdanov S., Ibáñez Ochoa R., Calderone N. (1999). Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. Apidologie, 30: 209-228.
- Inoue, K. (1980). Relationship between dicofol resistance and fitness in the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor). J Pestic Sci, 5, 165–175.
- Isman M. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection, 19: 603-608.
- Jakoby W.B. (1985). Glutathione transferases: An overview. Methods Enzymol, 113: 495-499.
- Johnson R.M., Wen Z., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2006). Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. J Econ Entomol, 99: 1046-1050.
- Johnson R.M., Pollock H.S., Berenbaum M.R. (2009). Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. J Econ Entomol, 102: 474–479.
- Johnson R.M., Ellis M.D., Mullin C.A., Frazier M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity – USA. Apidologie, 41: 312-331.
- Keller I., Fluri P., Imdorf A. (2005). Pollen nutrition and colony development in honey bees – Part II. Bee World, 86(2): 27-34.
- Kendall, M. (1938). A New Measure of Rank Correlation. Biometrika, 30(1-2): 81-89.

- Khajehali J., Van Leeuwen T., Grispou M., Morou E., Alout H., Weill M., Tirry L., Vontas J., Tsagkarakou A. (2010). Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. *Pest Manag Sci*, 66: 220-228.
- Kim Y.H., Kim J.H., Kim K., Lee S.H. (2017). Expression of acetylcholinesterase 1 is associated with brood rearing status in the honey bee, *Apis mellifera*. *Sci Rep*, 7: 39864.
- Klein A., Vaissiere B., Cane J., Steffan-Dewenter I., Cunningham S., Kremen C., Tscarntke T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc R Soc Lond B Biol.Sci*, 274(608): 303–313.
- Koch W., Ritter W. (1991). Experimental examination concerning the problem of deformed emerging bees after infestation with *Varroa jacobsoni*. *J Vet M*, 38: 337-344.
- Kralj J., Fuchs S. (2006). Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie*, 37: 577-587.
- Kralj J., Brockmann A., Fuchs S., Tautz J. (2007). The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *J Comp Physiol*, 193: 363-370.
- Kraus B., Koeniger N., Fuchs S. (1994). Screening of substances for their effect on *Varroa jacobsoni*: attractiveness, repellency, toxicity and masking effects of ethereal oils. *J Apic Res*, 33: 34-43.
- Kuenen L.P.S., Calderone N.W. (1997). Transfers of *Varroa* mites from newly emerged bees: preferences for age- and function-specific adult bees. *J Insect Behav*, 10: 213–228.
- Kwon D.H., Im J.S., Ahn J.J., Lee J.H., Clark J.M., Lee S.H. (2010). Acetylcholinesterase point mutations putatively associated with monocrotophos resistance in the two-spotted spider mite. *Pestic Biochem Physiol*, 96: 36-42.
- Le Conte Y., Arnold G. (1988.) Étude du thermopréférendum de *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 19: 155-164.
- Le Conte Y., Ellis M., Ritter W. (2010). *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41: 353–363.
- Lee, K. (1991). Glutathione S-transferase activities in phytophagous insects: Induction and inhibition by plant phototoxins and phenols. *Insect Biochem*, 21: 353-361.

- Levy S. (2011). What's best for bees. *Nature*, 479: 164-165.
- Li X.C., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol*, 52: 231-253.
- Liao L.H., Wu W.Y., Berenbaum M.R. (2017). Impacts of dietary phytochemicals in the presence and absence of pesticides on longevity of honey bees (*Apis mellifera*). *Insects*, 8: 1-13.
- Liebig G. (2001). How many *Varroa* mites can be tolerated by a honey bee colony? *Apidologie*, 32: 482–484.
- Lindberg C.M., Melathopoulos A.P., Winston M.L. (2000). Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni*, a honey bee parasite. *J Econ Entomol*, 93: 189-198.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25: 402-408.
- Lodesani M., Colombo M., Spreafico M. (1995). Ineffectiveness of Apistan(R) treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie*, 26: 67–72.
- Lodesani M., Costa C., Serra G., Colombo R., Sabatini A.G. (2008). Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie*, 39(3): 324-333.
- Loglio G., Plebani G. (1992). Valutazione dell'efficacia dell'Apistan. *Apic Mod*, 83: 95-98.
- Loper G.M., Berdel R.L. (1980a). A nutritional bioassay of honeybee broodrearing potential. *Apidologie*, 11: 181-189.
- Loper G.M., Berdel R.L. (1980b) The effects of nine pollen diets on broodrearing of honeybees. *Apidologie*, 11: 351-359.
- Maggi M.D., Ruffinengo S.R., Gende L., Eguaras M.J., Sardella N. (2008). LC₅₀ baseline levels of amitraz, coumaphos, fluvalinate and flumethrin in populations of *Varroa destructor* from Buenos Aires Province, Argentina. *J Apicult Res*, 47: 292–295.
- Maggi M.; Ruffinengo S.; Damiani N.; Sardella N.; Eguaras M. (2009). First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. *Exp Appl Acarol*, 47: 317-320.

- Maggi M.D. (2010). Biología, ecología y control de *Varroa destructor*, Anderson & Trueman 2000. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Maggi M.D., Ruffinengo S.R., Negri P., Eguaras M.J. (2010). Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitol Res*, 107: 1189–1192.
- Maggi M.D., Ruffinengo S.R., Mendoza Y., Ojeda P., Ramallo G., Floris I., Eguaras M.J. (2011). Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: *Varroa* mites' potential to develop acaricide resistance. *Parasitol Res*, 108:815–821
- Maggi M.D., Antúnez K., Invernizzi C., Aldea P., Vargas M., Negri P., Brasesco C., De Jong D., Message D., Teixeira E.W., Principal J., Barrios C., Ruffinengo S., Rodríguez Da Silva R., Eguaras M. (2016). Honeybee health in South America. *Apidologie*, 47: 835–854.
- Mannervik B., Alin P., Guthenberg C., Jensson H., Tahir M.K., Warholm M., Jörnvall H., (1985). Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 7202-7206.
- Mao W., Rupasinghe S.G., Johnson R.M., Zangerl A.R., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2009). Quercetin-metabolizing CYP6AS enzymes of the pollinator *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Comp Biochem Physio B*, 154: 427-434.
- Mao W., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2011). CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc Natl Acad Sci*, (108): 12657-12662.
- Mao W., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2013). Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proc Natl Acad Sci*, 110: 8842-8846.
- Mao W., Schuler M.A., Berenbaum M.R. (2015). A dietary phytochemical alters caste-associated gene expression in honey bees. *Sci Adv*, 1: 1-9.
- Marcangeli J., García M. (2004). Effect of *Apis mellifera* (Apidae) honeybee brood amount on Oxavar acaricide efficacy against the mite *Varroa destructor* (Varroidae). *Rev Soc Entomol Arg*, 63(3-4): 35-38.
- Marcangeli J., García M., Vega C., Quiroga A., Martín M., Distéfano L., Cano G. (2005). Estudio sobre la Eficacia a Campo del Amivar® contra *Varroa destructor*

- (Mesostigmata: Varroidae) en Colmenas de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Rev Soc Entomol Arg, 64(1-2): 29-33.
- Martel A.C., Zeggane S., Aurieres C., Drajnudel P., Faucon J.P., Aubert M. (2007). Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar? or Asuntol? Apidologie, 50(38): 534–544.
- Martin S. (1994). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. Exp Appl Acarol, 18: 87-100.
- Martin S. (1995). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in drone brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. Exp Appl Acarol, 19: 199-210.
- Martin S. (1998). A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Ecol Model, 109: 267–281.
- Martin S (2001). *Varroa destructor* reproduction during the winter in *Apis mellifera* colonies in UK. Exp Appl Acarol, 25: 321–325.
- Martin S.J., Elzen P. J., & Rubink W.R. (2002). Effect of acaricide resistance on reproductive ability of the honey bee mite *Varroa destructor*. Exp Appl Acarol, 27: 195–207.
- Martin S.J. (2004). Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. Bee World, 85: 67-69.
- Martin S.J., Highfield A.C., Brettell L., Villalobo EM., Budge, G.E., Powell M., Nikaido S., Schroeder D.C. (2012). Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. Science, 336: 1304.
- Mathieu L., Faucon J. (2000). Changes in the response time for *Varroa jacobsoni* exposed to amitraz. J Apic Res, 39(3-4): 155–158.
- Medici S.K., Maggi M.D., Sarlo E.G., Ruffinengo S., Marioli J.M., Eguaras M.J. (2016). The presence of synthetic acaricides in beeswax and its influence on the development of resistance in *Varroa destructor*. J Apicult Res 54(3): 267-274.
- Milani N., Barbattini R. (1988). Effectiveness of Apistan (fluvalinate) in the control of *Varroa jacobsoni* Oude-mans and its tolerance by *Apis mellifera* Linnaeus. Apicoltura, 4: 39-58.
- Milani N. (1995). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. Apidologie, 26: 415-429.

- Milani N., Lob M. (1998). Plastic strips containing organophosphorous acaricides to control *Varroa jacobsoni*. Am Bee J, 138: 612–615.
- Milani N., Della Vedova G. (2002). Decline in the proportion of mites resistant to fluvalinate in a population of *Varroa destructor* not treated with pyrethroids. Apidologie, 33(4): 417-422.
- Moore J., Jironkin A., Chandler D., Burroughs N., Evans D.J., Ryabov E.V. (2011). Recombinants between Deformed wing virus and *Varroa destructor* virus-1 may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies. J Gen Virol, 92: 156-161.
- Moretto G., Gonçalves L.S., de Jong D. (1991). The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud. infestations in Brazil. Apidologie, 22:197–203.
- Mozes-Koch R., Slabezki Y., Efrat H., Kalev H., Kamer Y., Yakobson B.A., Dag A. (2000). First detection in Israel of fluvalinate resistance in the varroa mite using bioassay and biochemical methods. Exp Appl Acarol, 24: 35-43.
- Mullin C.A., Frazier M., Frazier J.L., Ashcraft S., Simonds R., vanEngelsdorp D., Pettis J.S., (2010). High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. PloS One, 5(3), e9754.
- Mutinelli F., Cremasco S., Irsara A. (1994). Formic acid in the control of Varroaosis: a practical approach. J Vet Med B, 41: 433-440.
- Mutti N.S., Dolezal A.G., Wolschin F., Mutti J.S., Gill K.S., Amdam G.V. (2011). IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate. J Exp Biol, 214: 3977-3984.
- Naggar A.Y., Codling G., Vogt A., Naiem E., Mona M., Seif A., Giesy J.P. (2015). Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt, 114: 1-8.
- Nasr M., Wallner K. (2003). Residues in Honey and Wax: Implications and Safety, Proc. of the North American Apicultural Research Symposium, Am Bee J, 143: 322.
- Nation J.L., Sanford M.T., Milne K. (1992). Cuticular hydrocarbons from *Varroa jacobsoni*. Exp Appl Acarol, 16: 331–344.
- Naug D. (2009). Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. Biol Conserv, 142: 2369-2372.
- Negri P., Maggi M.D., Ramirez L., De Feudis L., Szwarski N., Quintana S., Eguaras M.J., Lamattina L. (2015). Abscissic acid enhances the immune response in *Apis*

- mellifera* and contributes to the colony fitness. *Apidologie*, 46: 542-557.
- Neumann P., Carreck N.L. (2010). Honey bee colony losses. *J Apic Res*, 49: 1–6.
- Nicolson S.W., Human H. (2008). Bees get a head start on honey production. *Biol Lett*, 4: 299-301.
- Oakeshott J.G., Claudianos C., Campbell P.M., Newcom R.D., Russel, R.J. (2005a). Biochemical genetics and genomics of insect esterases. In: Iatrou, K., Gilbert, L.I., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier, Oxford UK, (5): 309-382
- Oakeshott J.G., Devonshire A. L., Claudianos C., Sutherland T. D., Horne I., Campbell P.M., Ollis D.L., Russell R.J. (2005b). Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. *Chemico-Biological Interactions*, 157-158, 269-275.
- Oh S.H., Kozaki T., Mizuno H., Tomita T., Kono Y. (2006). Expression of Aceparalogous acetylcholinesterase of *Culex tritaeniorhynchus* with an amino acid substitution conferring insecticide insensitivity in baculovirus-insect cell system. *Pestic Biochem Physiol*, 85: 46-51
- Omoto C., Dennehy T.J., McCoy C.W., Crane S.E., Long J.W. (1995). Management of citrus rust mite (Acari: Eriophyidae) resistance to dicofol in Florida citrus. *J Econ Entomol*, 88: 1120–1128.
- Onstad D.W. (2008). *Insect resistance management: Biology, economics and prediction*. San Diego, CA: Academic Press.
- O'Reilly A.O., Khambay B.P.S., Williamson M.S., Field L.M., Wallace B.A. (2006). Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem J*, 396: 255–263.
- O'Reilly A.O., Williamson M.S., González-Cabrera J., Turberg A., Field L.M. (2013). Predictive 3D modelling of the interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channels of ticks and mites. *Pest Man Sci*, 70(3), 369-377.
- Overmeer W.P.J., Van Zon A.Q., Helle W. (1975). The stability of acaricide resistance in spider mite (*Tetranychus urticae*) populations from rose houses. *Entomol exp applicat*, 18: 68–74.
- Papadopoulos A.I., Polemitou I., Laifi P., Yiangou A. Tananaki C. (2004). Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera* macedonica kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee.

Comp Biochem Phys C, 139: 93-97.

- Peng Y.S., Fang Y.Z., Xu S.Y., Ge L.S. (1987). The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. J Invert Pathol, 49(1): 54-60.
- Pankiw T., Sagili R.R., Metz B.N. (2008). Brood pheromone effects on colony protein supplement consumption and growth in the honey bee (Hymenoptera: Apidae) in a subtropical winter climate. J Econ Entomol, 101: 1749-1755.
- Perez Santiago G., Otero Colina G., Mota Sanchez D., Ramirez Guzman M., Vandame R. (2000). Comparing effects of three acaricides on *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) using two application techniques. Florida Entomol, 83(4): 468–476.
- Pernal S.F., Currie R.W. (2000). Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). Apidologie, 31: 387-409.
- Perry E., Walker M., Grace J., Perry R. (1999). Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? Trends Neurosci, 22(6): 273-280.
- Pettis J.S., Collins A.M., Wilbanks R., Fellauf M.F. (2004). Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. Apidologie, 35: 605–610.
- Pilling E.D., Bromleychallenor K.A.C., Walker C.H., Jepson P.C. (1995). Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide λ -cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). Pestic Biochem Physiol, 5(1): 1-11.
- Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O., Kunin W.E. (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. Trends Ecol Evol, 25: 345-353.
- Puerta F., Flores J., Cuesta J., Bustos M., Padilla F. (1990). *Varroa*, enfermedades secundarias. Vida apícola, 43: 56-59.
- Ramsey S., Gulbranson C., Mowery J.D., Ochoa R., VanEngelsdorp D., Baughan G.R. (2018). A Multi-Microscopy Approach to Discover the Feeding Site and Host Tissue Consumed by *Varroa destructor* on Host Honey Bees. Microsc Microanal, 24(S1):1258-1259.
- Rath W. (1999). Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie, 30: 97-110.
- Reeves A.M., O'Neal S.T., Fell R.D., Brewster C.C., Anderson T.D. (2018). In-Hive

- Acaricides Alter Biochemical and Morphological Indicators of Honey Bee Nutrition, Immunity, and Development. *J Insect Sci*, 18(5): 8.
- Rehm S., Ritter W. (1989). Sequence of sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the developmental period. *Apidologie*, 20: 339-343.
- Ribiere M., Olivier V., Blanchard P., Schurr F., Celle O., Drajnudel P., Faucon J.P., Thiery R., Chauzat M.P. (2008). The collapse of bee colonies: the CCD case ("Colony collapse disorder") and the IAPV virus (Israeli acute paralysis virus). *Virologie*, 12(5): 319–322.
- Rickli M., Imdorf A., Kilchenmann V. (1991). Treatment of *Varroa* disease using compounds of essential oils. *Apidologie*, 22: 417-421.
- Rickli M., Diehl P.A., Guerin P.M. (1994). Cuticle alkanes of honeybee larvae mediate arrestment of bee parasite *Varroa jacobsoni*. *J Chem Ecol*, 20: 2437–2453.
- Rinderer T.E., Guzman L.I., Lancaster V.A., Delatte G.T., Stelzer J.A. (1999). *Varroa* in the mating yard: I. The effects of *Varroa jacobsoni* and Apistan on drone honey bees. *Am Bee J*, 139: 134-139.
- Rinkevich F.D., Du Y., Dong K. (2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pest Biochem Physiol*, 106: 93–100.
- Ritter W. (1981). *Varroa* disease of the honeybee *Apis mellifera*. *Bee World*, 62: 141–153.
- Ritter W. (1988) *Varroa jacobsoni* in Europe, the tropics, and subtropics. In: Needham G. R., Page R.E., Delfinado-Baker M., Bowman E.E. (eds.): *Afric. Honey Bees and Bee Mite*, 349-359. Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- Ritter W., de Jong D. (1984). Reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud. in Europe, the middle East and tropical South America. *Z Angew Entomol*, 98: 55–57.
- Rodríguez-Dehaibes, S.R., Otero-Colina, G., Pardio Sedas, V., Villanueva Jiménez, J.A. (2005). Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz. *Journal of Apicultural Research*, 44: 124–125.
- Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol*, 103: S96–S119.
- Ruffinengo S., Eguaras M., Floris I., Faverin C., Bailac P., Ponzi M. (2005). LD₅₀ and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa*

- destructor*. J Econ Entomol, 98(2): 651-655.
- Sammataro D., Untalan P., Guerre F., Finley J. (2005). The resistance of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. Internat J Acarol, 31(1): 67-74.
- Samson-Robert O., Labrie G., Mercier P.L., Chagnon M., Derome N., Fournier V. (2015). Increased acetylcholinesterase expression in Bumble bees during neonicotinoid-coated corn sowing. Sci Rep, 5: 1-8.
- Sato M.E., Miyata T., da Silva M., Raga A., de Souza Filho M.F. (2004). Selections for fenpyroximate resistance and susceptibility, and inheritance, crossresistance and stability of fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Appl Entomol Zool, 39: 293–302.
- Sato M.E., da Silva M.Z., Raga A., de Souza Filho M.F. (2005). Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): Selection, cross-resistance and stability of resistance. Neotrop Entomol, 34(6): 991-998.
- Schatton-Gademayer K., Engels W. (1988). Hemolymph proteins and body weight in newly emerged worker honey bees according to different rates of parasitization by brood mites (Hymenoptera: Apidae: *Apis mellifera* / Acarina: Varroidae: *Varroa jacobsoni*). Entomol Gen, 14(2): 93-101.
- Schmehl D.R., Teal P.E.A., Frazier J.L., Grozinger C.M. (2014). Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). J Insect Physiol, 71: 177-190.
- Schmickl T., Crailsheim K. (2001). Cannibalism and early capping: strategies of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. J Comp Physiol A 187(7): 541-547.
- Schmickl T., Crailsheim K. (2002). How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behavior in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions. Behav, Ecol Sociobiol, 51(5): 415-425.
- Schmickl T., Crailsheim K. (2004). Inner nest homeostasis in a changing environment with special emphasis on honey bee brood nursing and pollen supply. Apidologie, 35: 249-263.
- Schmidt J.O., Buchmann S.L. (1985). Pollen digestion and nitrogen-utilization by *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). Comp Biochem Physiol, 82: 499-503.
- Schmid-Hempel P. (1995). Parasites and social insects. Apidologie, 26: 255-271.

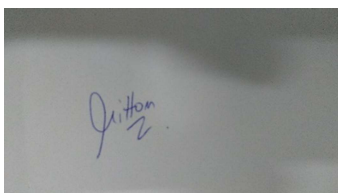
- Schneider P., Drescher W. (1987). The influence of *Varroa jacobsoni* Oud. on weight at emergence, development of weight and hypopharyngeal glands, and longevity of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 18(1): 101-110.
- Schroeder A., Wallner K., Weber D. (2004). Amitraz als Varroa zid – Einfluss auf die Honigqualität. *Apidologie*, 35(5): 535–536.
- Seeley T.D. (1989). The honey bee colony as a superorganism. *Am Sci*, 77: 546-553.
- Shen M., Yang X., Cox-Foster D., Cui L. (2005). The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology*, 342(1): 141-149.
- Shimanuki H., Calderone N.W., Knox D.A. (1994). Parasitic mite syndrome: the symptoms. *Am Bee J*, 134: 827-828.
- Simon S., Petrášek J. (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180(3): 454-460.
- Smissaert H.R. (1964). Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible resistant to organophosphate. *Science*, 143: 129-131.
- Smith D. (1991). Diversity in the genus *Apis*. Westview Press Inc.
- Soderlund D.M., Bloomquist J.R. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Ann Rev Entomol*, 34: 77–96.
- Solignac M., Cornuet J.M., Vautrin D., Le Conte Y., Anderson D., Evans J., Cros-Arteil S., Navajas M. (2005). The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proc R Soc Lond Ser B-Biol Sci*, 272: 411–419.
- Spreafico M., Eordegh F.R., Bernardinelli I., Colombo M. (2001). First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials. *Apidologie*, 32: 49-55.
- Stahlberg A., Hakansson J., Xian X., Semb H., Kubista M. (2004). Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clin Chem*, 50: 509-515.
- Steiner J., Dittmann F., Rosenkranz P., Engels W. (1994). The first gonocycle of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *Invertebr Rep Develop*, 25: 175–183.
- Steiner J., Diehl P.A., Vlimant M. (1995). Vitellogenesis in *Varroa jacobsoni*, a parasite

- of honey bees. *Exp Appl Acarol*, 19: 411–422.
- Stone B., Nolan J., Schuntner C. (1976). Biochemical Genetics of Resistance to Organophosphorus Acaricides in Three Strains of the Cattle Tick, *Boophilus microplus*. *Austral J Biol Sci*, 29: 265-279.
- Teeters B.S., Johnson R.M., Elli, M.D., Siegfried B.D. (2012). Using video-tracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). *Environ Toxicol Chem*, 31: 1349–1354.
- Thompson H.M., Brown M.A., Bal R.F., Bew M.H. (2002). First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in U.K. *Apidologie*, 33: 357–366.
- Thompson H.M., Maus C. (2007). The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. *Pest Man Sci*, 63: 1058-1061.
- Tihelka E. (2017). The immunological dependence of plant-feeding animals on their host's medical properties may explain part of honey bee colony losses. *Arthropod Plant Interact*, 12: 57-64.
- Toutant J.P., Massoulié J. (1988). Cholinesterases: Tissue and Cellular Distribution of Molecular Forms and Their Physiological Regulation. In: Whittaker V.P. (eds) *The Cholinergic Synapse. Handbook of Experimental Pharmacology*, vol 86. Springer, Berlin, Heidelberg.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1986). Hazard evaluation division. Standard evaluation procedure. Ecological Risk Assessment EPA 540/9-85-001. USEPA, Washington DC.
- van der Steen J. (2007). Effect of a home-made pollen substitute on honey bee colony development. *J Apic Res*, 46: 114-119.
- Van Leeuwen T., Vontas J., Tsagkarakou A., Dermauw W., & Tirry L. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochem Molec*, 40: 563-572.
- Vandame R., Colin M.E., Belzunces L.P., Jourdan, P. (1995). Resistance de varroa au fluvalinate [Resistance of Varroa to fluvalinate]. *Les Carnets du Cari*, 46: 5–11.
- Vannette R.L., Mohamed A., Johnson B.R. (2015). Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Sci Rep*, 5: 16224.
- Villa J.D., Bustamante D.M., Dunkley J.P., Escobar L.A. (2008). Changes in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony swarming and survival pre- and postarrival of

- Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Louisiana. Ann Entomol Soc Am, 101(5): 867–871.
- Vossen R.H.A.M., Aten E., Ross A., den Dunnen J.T. (2009). High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening. Mun Mutat, 30: 1-7.
- Wallner K. (1999). Varroacides and their residues in bee products. Apidologie, 30: 235-248.
- Watkins M. (1997). Resistance and its relevance to beekeeping. Bee World, 78: 15-22.
- Wiesen L.B., Bender R.L., Paradis T., Larson A., Perepa M.A.D.N., Nikolau B.J., Olszewski N.E., Carter C.J. (2016). A role for GIBBERELLIN 2-OXIDASE6 and gibberellins in regulating nectar production. Mol Plant, 9:753-756.
- Williams G., Alaux C., Costa C., Csáki T., Doublet V., Eisenhardt D., Fires I., Kuhn R., McMahon D.P., Medrzycki P., Murray T.E., Natsopoulou M.E., Neuman P., Oliver R., Paxton R.J., Pernal S.F., Shutler D., Tanner G., van del Steen J.J.M., Brodschneider R. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under *in vitro* laboratory conditions. Beebook, Volumen 1, Cap III, Journal of Apicultural Research, 52(1): 1-36.
- Williamson M.S., Martínez Torres D., Hick C.A., Devonshire A.L. (1996). Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. Mol Gen Genet, 252: 51-60.
- Williamson S.M., Wright G.A. (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. J Exp Biol 216: 1799-1807.
- Winston M.L. (1987). Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Winston M.L. (1998). From where I sit: essays on bees, beekeeping, and science. Cornell University Press. Ithaca. New York.
- Wu J.Y., Anelli C.M., Sheppard W.S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. PLoS One, 6(2), e14720.
- Xu J., Strange J.P., Welker D.L. James R.R. (2013). Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). BMC Genomics 14: 874.

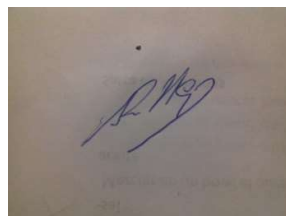
- Yang X., Cox-Foster D. (2007). Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology*, 134: 405-412.
- Yue C., Genersch E. (2005). RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol*, 86: 3419-3424.
- Zar J.H. (1984). *Biostatistical Analysis*, second ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Zhu W., Schmehl D.R., Mullin C.A., Frazier J.L. (2014). Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS One*, 9(1), e77547.

Los abajo firmantes entregamos la Tesis Doctoral: “**Resistencia a xenobióticos y procesos de detoxificación. Estudios moleculares en *Varroa destructor* y *Apis mellifera***” para su evaluación.

A close-up photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored surface. The signature appears to read 'Giulia A. Mitton'.

Lic. Giulia A. Mitton

TESISTA

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored surface. The signature is stylized and appears to read 'Sergio R. Ruffinengo'.

Dr. Sergio R. Ruffinengo

DIRECTOR

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored surface. The signature is stylized and appears to read 'Matías D. Maggi'.

Dr. Matías D. Maggi

CO-DIRECTOR

